

Université de Sherbrooke

Analyse de l'expression des chaînes du collagène de type IV au cours du
développement de l'intestin humain: identification d'un second
réseau de collagène IV

par

Aline Simoneau

Département d'anatomie et de biologie cellulaire

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine

en vue de l'obtention du grade de

Maître ès science (M. Sc.)

Sherbrooke, Juin 97



National Library
of Canada

Acquisitions and
Bibliographic Services

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque nationale
du Canada

Acquisitions et
services bibliographiques

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file Votre référence

Our file Notre référence

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-26617-6

À Stéphane, Francine,
Joseph, Chantal et Mélanie à
qui je dédie ces pages en
signe de reconnaissance pour
leur soutien...

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES ILLUSTRATIONSIX
LISTE DES ABRÉVIATIONS	XII
LISTE DES PUBLICATIONS	XIII
RÉSUMÉ	XIV
I. INTRODUCTION	1
1- Développement de l'intestin humain	1
1.1 Intestin grêle	1
1.2 Côlon	2
1.3 Axe crypte-villosité	2
2- Microenvironnement cellulaire et moléculaire des entérocytes	3
3- Lamelle basale	5
4- Collagène de type IV	6
4.1 Structure et assemblage	6
4.2 Famille	8
4.3 Distribution des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$	9
4.4 Expression des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 5(\text{IV})$ au niveau de l'intestin grêle	9

5- Pathologies associées au collagène de type IV	10
5.1 Maladie de Goodpasture	11
5.2 Syndrome d'Alport et léiomyomatose oesophagienne diffuse	11
6- Objectifs du projet de maîtrise	14
 II. MATÉRIEL ET MÉTHODES	 15
1- Spécimens	15
1.1 Tissus foetaux et adultes humains	15
1.2 Isolement des cellules épithéliales et mésenchymateuses d'intestin grêle foetal humain par Matrisperse	 15
2- Culture de cellules	16
2.1 Cellules Caco-2/15	16
2.2 Cellules épithéliales intestinales humaines (HIEC)	17
2.3 Cellules mésenchymateuses d'intestin humain (HIM)	18
2.4 Co-culture	18
3- Localisation des chaînes du collagène IV par immunofluorescence indirecte	 19
3.1 Préparation des spécimens	19
3.1.1 Co-culture	19
3.1.2 Tissus humains	19
3.2 Coupes de tissus	20
3.3 Procédure d'immunofluorescence indirecte	20

4- Étude de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ par transfert	
Western	23
4.1 Préparation des échantillons	23
4.1.1 Les cellules Caco-2/15, HIEC et HIM	23
4.1.2 Les cellules épithéliales et mésenchymateuses isolées par Matrisperse	23
4.2 Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant . .	24
4.3 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose	25
4.4 Détection des antigènes	25
5- Extraction des ARNs	26
5.1 Préparation des spécimens	26
5.1.1 Intestins foetaux et adultes	26
5.1.2 Cellules épithéliales et mésenchymateuses isolées par Matrisperse	27
5.1.3 Cellules Caco-2/15, HIEC et HIM	27
5.2 Extraction des ARNs totaux	27
5.3 Extraction des ARNs poly(A)	28
6- Transfert Northern	29
6.1 Préparation et marquage des sondes	29
6.2 Séparation des ARNs sur gel d'agarose	30
6.2.1 Préparation des échantillons d'ARN	30
6.2.2 Préparation de gel d'agarose	30
6.3 Transfert des ARNs sur membrane de nylon	31

6.4 Pré-hybridation, hybridation et détection des signaux radioactifs .	31
7- Étude RT-PCR de l'expression des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) par rapport	
au S14	32
7.1 Réaction de transcription inverse	32
7.2 Réaction de polymérisation (PCR)	33
7.3 Migration des échantillons de RT-PCR	34
8- Inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ (IV) via le système inductible	
LacSwitch	35
8.1 Clonage de l'ADNc anti-sens de la chaîne $\alpha 5$ (IV) dans le vecteur	
pOPRSVICAT	35
8.1.1 Préparation du vecteur pOPRSVICAT pour le clonage	
de l'anti-sens de la chaîne $\alpha 5$ (IV)	35
8.1.2 Préparation de l'anti-sens $\alpha 5$ (IV) pour son clonage	
dans le vecteur pOPRSVI	38
8.1.3 Ligation, transformation et extraction plasmidique	39
8.2 Transfection des cellules Caco-2/15 selon la méthode au	
phosphate de calcium	40
8.2.1 Transfection du vecteur p3'SS	40
8.2.2 Transfection du vecteur pOPRSVICOL4A5	41
9- Inhibition de l'expression des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) via le système	
inductible Tet-on	42
9.1 Transfection des cellules Caco-2/15 par le vecteur p172-1 neo	
selon la méthode à la lipofectamine	42

9.2 Analyse du taux d'inductibilité des cellules transfectées par le vecteur pUHC 13-3	44
9.2.1 Transfection du vecteur pUHC 13-3 selon la méthode à la lipofectamine	45
9.2.2 Essais luciférase	45
III. RÉSULTATS	46
1- Étude de la localisation des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV	
au cours du développement de l'intestin grêle humain	46
1.1 Jéjunum foetal	46
1.2 Jéjunum adulte	49
2- Étude de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV	
au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15	49
2.1 Transcrits des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV)	50
2.2 Protéines des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV)	52
3- Origine cellulaire et déposition des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV	56
4- Inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ (IV) via le système inductible LacSwitch	61
4.1 Analyse des clones transfectés par le vecteur p3'SS	61
4.2 Analyse des clones transfectés par le vecteur pOPRSVICOL4A5.....	63
5- Inhibition de l'expression des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) via le système inductible Tet-on	66

IV. DISCUSSION	69
1- Localisation du collagène de type IV dans l'intestin grêle humain	69
2- Étude de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales	72
3- Origine cellulaire des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV déposé au niveau de la lame basale intestinale	73
4- Détermination des rôles fonctionnels des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV	75
V. CONCLUSION	80
REMERCIEMENTS	83
BIBLIOGRAPHIE	84

LISTE DES ILLUSTRATIONS

Figures

1. Fonctionnement du système inductible LacSwitch.....36
2. Procédure de clonage de l'ADNc COL4A5 dans le vecteur pOPRSVICAT.....37
3. Fonctionnement du système inductible Tet-on.....43
4. Immunodétection des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV dans le jéjunum d'intestin foetal.....47
5. Immunodétection des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV dans le jéjunum d'intestin adulte.....48
6. Analyse Northern de l'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 5$ (IV) dans l'intestin foetal et adulte ainsi qu'au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15.....51
7. Analyse Northern de l'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 6$ (IV) par les cellules Caco-2/15.....53

8.	Analyse RT-PCR de l'expression des transcrits des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15.....	54
9.	Analyse de l'expression des protéines des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15.....	55
10.	Analyse de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV par les cellules Caco-2/15, HIEC et HIM.....	57
11.	Analyse de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV par les cellules épithéliales et mésenchymateuses isolées par Matrisperse.....	59
12.	Immunodétection des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV sur des co-cultures de cellules Caco-2/15 et HIM.....	60
13.	Analyse de l'expression des transcrits de la sucrase-isomaltase et du répresseur lactose par les clones transfectés avec le vecteur p3'SS du système LacSwitch.....	62
14.	Analyse de l'expression des protéines de la sucrase-isomaltase, du répresseur lactose et de la chaîne $\alpha 5$ (IV) par les clones transfecté avec le vecteur p3'SS du système LacSwitch.....	64

15.	Analyse de l'expression des transcrits de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$, suite à l'induction par l'IPTG, des clones transfectés par les vecteurs du système LacSwitch.....	65
-----	---	----

Tableaux

1.	Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence indirecte et pour la détection des antigènes dans l'analyse Western.....	22
2.	Composition des gels d'acrylamide utilisés.....	24
3.	Composition du tampon d'électrophorèse de type Thomas et Kornberg.....	24
4.	Séquence des amorces utilisées pour la réaction de polymérisation.....	33
5.	Conditions d'amplification.....	34
6.	Inductibilité à la doxycycline des clones transfectés par les vecteurs p172-1 neo et pUHC 13-3.....	68

LISTE DES ABRÉVIATIONS

DMEM	: milieu d'Eagles modifié par Dulbecco
hEGF	: facteur de croissance épidermique humain
HIEC	: cellules épithéliales intestinales humaines
HIM	: cellules mésenchymateuses intestinales humaines
LOD	: léiomyomatose oesophagienne diffuse
MOPS	: tampon d'acide sulfonique 3-[N-morpholino]propane
PBS	: saline tamponnée aux ions phosphate
RT-PCR	: transcription inverse-réaction de polymérisation en chaîne
SA	: syndrome d'Alport
SDS	: sodium dodécyl sulfate
SSC	: sel de citrate de sodium
TBE	: tampon Tris-borate/EDTA pour électrophorèse
TRE	: élément sensible à la tétracycline

LISTE DES PUBLICATIONS

Simoneau A., Herring-Gillam E., Vachon P.H., Bouatrouss Y., Durand J., Zhou J., Beaulieu J.-F., Expression of the $\alpha 5(\text{IV})$ chains in the human colon tumor cell line Caco-2 (en préparation)

Vachon P.H., Simoneau A., Herring-Gillam E., Beaulieu J.-F., (1995) Cellular fibronectin expression is down-regulated at the mRNA level in differentiated human intestinal epithelial cells. *Experimental Cell Research* 216:30-34

Beaulieu J.-F., Vachon P.H., Herring-Gillam E., Simoneau A., Perreault N., Asselin C., Durand J., (1994) Expression of the $\alpha 5(\text{IV})$ collagen chain in the fetal human small intestine. *Gastroenterology* 107:957-967

Desloges N., Simoneau A., Jutras S., Beaulieu J.-F., (1994) Tenascin may not be required for intestinal villus development. *Intestinal Journal Developmental Biology* 38:727-739

RÉSUMÉ

Analyse de l'expression des chaînes du collagène de type IV au cours du développement de l'intestin humain: identification d'un second réseau de collagène IV

Aline Simoneau

Département d'anatomie et de biologie cellulaire, Faculté de médecine,
Université de Sherbrooke

Le collagène de type IV est un composé majeur des lames basales. La famille du collagène IV est composée de six chaînes polypeptidiques ($\alpha 1$ à $\alpha 6$) qui sont génétiquement distinctes mais dont la structure est semblable. Les chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ sont des constituants ubiquitaires de toutes les lames basales alors que les autres chaînes ont une distribution beaucoup plus restreinte. Les chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ sont retrouvées à la base de l'épithélium à tous les stades du développement intestinal et les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$ ne sont pas détectées au niveau de l'intestin. Dans la présente étude, nous avons analysé l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au cours du développement et de la différenciation dans l'intestin. Par immunofluorescence indirecte, les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont co-exprimées au niveau du domaine basolatéral des cellules épithéliales et la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est détectée au niveau du mésenchyme de l'intestin foetal. Au cours du développement intestinal, l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est régulée négativement alors que celle de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ est maintenue au niveau de l'intestin adulte. L'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ diffère au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 (lignée de cellules épithéliales intestinales). Par analyse Northern, le transcrit de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ présente une expression maximale peu après la différenciation des cellules et on observe, par transfert Western, une accumulation de sa protéine au cours de la différenciation de la lignée cellulaire Caco-2/15. Les niveaux protéiques de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ demeurent stables peu importe le stade de confluence. *In vitro*, les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont exprimées par les cellules épithéliales et mésenchymateuses, suggérant une double origine de ces chaînes déposées au niveau de la lame basale épithéliale. À l'heure actuelle, les rôles fonctionnels qu'exercent ces deux chaînes de collagène IV sont encore inconnus. Cependant, la mise au point d'un système inductible permettant l'inhibition de l'expression de ces chaînes pourrait bientôt révéler d'importants indices sur les fonctions biologiques de ces molécules. Finalement, ces données indiquent que la lame basale épithéliale de l'intestin contiendrait quatre chaînes de collagène IV. En plus du collagène classique $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$, un second réseau de collagène IV composé des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ serait présent.

I. INTRODUCTION

1- Développement de l'intestin humain

1.1 Intestin grêle

La morphogénèse intestinale est un processus multiphasique au cours duquel l'intestin primitif évolue et se spécialise avec la formation de segments intestinaux distincts. Contrairement au développement intestinal chez le rat et la souris qui n'ont qu'une courte période de gestation (19-21 jours), l'intestin humain acquiert sa maturité structurale et fonctionnelle sur une longue période (environ 10 semaines). À la huitième semaine de gestation, la paroi de l'intestin grêle humain consiste simplement en un tube recouvert d'un épithélium pluristratifié. La formation des villosités, par l'infiltration du mésenchyme dans l'épithélium pluristratifié, débute dans l'intestin proximal dès la neuvième semaine. La formation des villosités se poursuit plus distalement, jusqu'à ce que l'intestin grêle entier soit recouvert de courtes villosités avec un épithélium simple et cylindrique (11-12 semaines de gestation). Vers la quatorzième semaine de gestation, les cryptes primitives commencent à se développer. À la mi-gestation (vers 20 semaines), la morphologie de la muqueuse de l'intestin grêle foetal ressemble déjà à celle de la muqueuse de l'intestin grêle adulte avec des cryptes et villosités bien développées (MÉNARD, 1989; MÉNARD et BEAULIEU, 1994).

1.2 Côlon

Le côlon se développe de façon similaire à l'intestin grêle. Ce processus est par contre effectué à partir de la portion la plus distale du côlon vers sa portion antérieure, avec environ deux semaines de retard sur le développement de l'intestin grêle. Entre huit et onze semaines de gestation, de nombreux replis longitudinaux se forment le long de la paroi du côlon. L'épithélium pluristratifié du côlon est remplacé par un épithélium simple cylindrique et, par la suite, la formation des villosités est initiée. Au même moment, les cryptes débutent leur formation avec le remodelage du mésenchyme voisin. Des cryptes sont observées dans tout le côlon entre les quatorzième et seizième semaines de gestation. Contrairement aux villosités de l'intestin grêle, les villosités du côlon sont des structures transitoires au cours du développement de ce segment, qui disparaissent entre la trentième semaine de gestation et la naissance (MÉNARD, 1989; MÉNARD et BEAULIEU, 1994).

1.3 Axe crypte-villosité

Les cellules qui composent l'épithélium de l'intestin grêle représentent un système très dynamique en perpétuel renouvellement. Ce processus implique la division des cellules souches localisées au fond de la crypte, la migration des cellules filles le long de la crypte et de la villosité, puis finalement la desquamation des cellules sénescents dans la lumière intestinale (HERMOS et al., 1971; ALTMANN et LEBLOND, 1982; POTTEN et LOEFFLER, 1991; PAUL et al., 1993).

Ceci permet de maintenir un équilibre entre les cellules hautement prolifératives et les cellules pleinement différenciées qui sont éliminées, gardant ainsi la masse épithéliale constante (PODOLSKY, 1993). Ce système à renouvellement continu se compose de deux compartiments cellulaires séparés, soit les compartiments prolifératif et différencié localisés respectivement à la base des cryptes et sur les villosités. L'épithélium des villosités est principalement composé de cellules absorbantes matures et de cellules à mucus, alors que les cryptes contiennent les cellules souches, les cellules en voie de différenciation ainsi que les cellules de Paneth. La différenciation de chacun des types cellulaires prend place au cours de la migration vers le haut de la villosité (cellules absorbantes, à mucus et entéro-endocrines) ou vers le bas de la crypte (cellules de Paneth) (BJERKNES et CHENG, 1981; LEBLOND, 1981). Les cellules de la crypte sont beaucoup plus prolifératives que différenciées, tandis que les cellules qui composent la villosité sont pleinement différenciées et possèdent des fonctions spécialisées de digestion et d'absorption (BARNARD et al., 1989). L'épithélium intestinal intact représente un système attrayant pour l'étude de la croissance et de la différenciation cellulaire.

2- Microenvironnement cellulaire et moléculaire des entérocytes

Comme pour les autres cellules épithéliales, les entérocytes ne peuvent pas être considérés comme une entité isolée. Il est de plus en plus évident que l'expression de gènes "tissus-spécifiques" requiert un microenvironnement cellulaire et moléculaire précis. Les éléments cellulaires de ce microenvironnement, d'abord suggérés par Le Douarin (LE DOUARIN, 1964), sont représentés par l'unité

épithélio-mésenchymateuse. Cette unité a clairement été définie dans différents organes, incluant l'intestin, par la démonstration de l'existence d'interactions permissive/instructive réciproques entre les compartiments épithéliaux et mésenchymateux, pendant le développement embryonnaire et post-natal de l'intestin grêle (HAFFEN et al., 1989; YASUGI, 1993). Une autre évidence que les entérocytes ne sont pas des entités isolées est que la différenciation *in vitro* des cellules de l'endoderme intestinal nécessite un support mésenchymateux (KEDINGER et al., 1987; STALLMACH et al., 1989; TAKIGUCHI-HAYACHI et YASUGI, 1990; YASUGI, 1993). Dans l'intestin en développement aussi bien qu'au niveau de l'axe crypte-villosité de l'intestin adulte, l'épithélium est toujours en étroite association avec les cellules de mésenchyme sous-jacentes (JOYCE et al., 1987).

Le troisième élément de cette unité est la matrice extracellulaire, en particulier la lame basale, laquelle est localisée à l'interface épithélio-mésenchymateuse (TIMPL et DZIADEK, 1986; MARTIN et al., 1988; LEBLOND et INOUE, 1989; MERKER, 1994; TIMPL et BROWN, 1996). Basé sur les observations que les cellules épithéliales sont en contact direct avec la lame basale et que les molécules qui la constituent ont été identifiées comme des effecteurs dynamiques de l'adhésion, de la migration et de la différenciation cellulaire, les composés de la lame basale ont reçu une attention particulière comme éléments clés du microenvironnement dit moléculaire (HAFFEN et al., 1989; BOSMAN et al., 1993; HAY, 1981; BISSELL et al., 1982; MONTESSANO, 1986; SANDERS, 1988; KLEINMAN et al., 1987; MCDONALD, 1989).

3- Lame basale

La lame basale est un mince feuillet spécialisé où se concentrent les composés de la matrice extracellulaire. Cette structure permet la compartimentalisation des tissus et fournit les substrats pour les cellules des organes ainsi que d'importants signaux pour la différenciation, le maintien et le remodelage des tissus (HUDSON et al., 1993). La lame basale intestinale contient tous les composés majeurs spécifiques à la plupart des lames basales, aussi bien que certaines macromolécules non-exclusives trouvées dans la matrice extracellulaire interstitielle (revue par BEAULIEU, 1997). La lame basale intestinale est donc composée du collagène de type IV, de la laminine, du nidogène (entactine) et du protéoglycan héparane sulfate ainsi que de deux constituants de la matrice interstitielle, la ténascine et la fibronectine cellulaire.

La composition de la lame basale peut varier le long de l'axe crypte-villosité et au cours du développement de l'intestin grêle. Ces changements de composition sont impliqués dans la régulation morphologique et fonctionnelle de l'intestin (ENGVAL, 1993; GARROD, 1993; LIN et BISSELL, 1993), via la présence de récepteurs spécifiques à la surface cellulaire (KURKINEN et al., 1984; AUMAILLY et TIMPL, 1984). Certains de ces récepteurs, dont ceux de la superfamille des intégrines, peuvent servir de connection structurale entre la matrice extracellulaire et le cytosquelette et moduler différentes activités de gènes (HYNES, 1992; SCHWARTZ, 1992; CYBULSKY et al., 1993).

4- Collagène de type IV

Les collagènes forment une superfamille de protéines structurales majeures de la matrice extracellulaire. Leur importance est plus évidente dans les tissus conjonctifs tels les os, le cartilage, les ligaments, les tendons, le derme et la dentine, où ils fournissent une matrice de fibres hautement organisée. Le collagène fournit également une intégrité structurale aux capsules, septum et laminae des systèmes gastrointestinal, cardiovasculaire, urogénital, respiratoire et nerveux. Les lames basales de collagène remplissent d'importantes fonctions structurales et physiologiques au niveau des reins, poumons et autres tissus. Les collagènes des yeux et oreilles ont aussi des rôles structuraux et physiologiques spécialisés (COLE, 1994).

Jusqu'à présent, on a identifié dix-neuf types de collagène (I-XIX) contenant plus de trente chaînes polypeptidiques distinctes codées par des gènes répartis sur au moins douze chromosomes (KIVIRIKKO, 1993; BROWN et TIMPL, 1995; PROCKOP et KIVIRIKKO, 1995). Ces molécules de collagène sont exprimées au niveau d'une variété de sites physiologiques, mais seul le collagène de type IV est retrouvé au niveau des lames basales.

4.1 Structure et assemblage

Le collagène de type IV est composé, comme les autres collagènes, de trois chaînes α enroulées en hélice (VAN DER REST, 1987; TIMPL, 1989; GIRY-

LOZINGUEZ et al., 1994). Chaque chaîne est constituée d'un long domaine collagénique d'environ 1,400 résidus d'acides aminés avec la séquence Glycine-X-Y où X et Y correspondent généralement aux acides aminés proline et hydroxyproline, respectivement. La glycine est le plus petit des acides aminés et sa présence toutes les trois positions est essentielle pour permettre l'enroulement de la triple-hélice. Le collagène de type IV fait partie de la classe des collagènes non fibrillaires et est constitué d'un long domaine collagénique avec des extrémités non collagéniques. Le domaine collagénique comporte une vingtaine de courtes interruptions non collagéniques, qui jouent probablement un rôle dans sa flexibilité. L'extrémité aminoterminal de la molécule, le domaine dit 7S, de 20 à 30 acides aminés, comporte des résidus cystéines impliqués dans les liaisons intermoléculaires, alors qu'à l'extrémité carboxyterminale persiste un domaine non collagénique dit NC1, d'environ 220 résidus, constitué de deux moitiés homologues contenant chacune six cystéines, responsables de la formation de ponts disulfures intra- et intermoléculaires. Ces propriétés permettent l'organisation du collagène IV en un réseau plan à la fois flexible et résistant dans les membranes basales.

La formation d'un tel réseau de collagène IV s'effectue via trois types d'interactions entre les molécules de collagène. Tout d'abord, ces molécules s'associent, pour former des dimères, via des interactions entre leur domaine NC1. Ces dimères vont ensuite s'associer via leur domaine 7S pour la formation de tétramères. À ces deux types d'interactions, s'ajoutent les interactions hélicoïdales latérales-latérales qui procurent la structure supramoléculaire du réseau de collagène IV des lames basales (MARTIN et al., 1988; BURBELO, 1990;

BURGESSON, 1992; HUDSON, 1992). Ces réseaux de collagène IV forment le treillis de base des lames basales sur lequel s'associent les autres constituants de la matrice extracellulaire (TIMPL, 1989; YURCHENCO, 1990; PAULSSON, 1992).

4.2 Famille

Actuellement, le collagène de type IV constitue une famille de six chaînes polypeptidiques ($\alpha 1$ - $\alpha 6$) génétiquement distinctes mais de structures semblables (HUDSON, 1993; OOHASHI et al., 1994; ZHOU et al., 1994). L'existence de six chaînes permet la formation de différentes molécules de collagène IV. Cependant, très peu d'information est connue sur leur composition exacte. Des évidences suggèrent la présence d'hétérotrimères composés des chaînes $(\alpha 1)_2\alpha 2$ et $(\alpha 3)_2\alpha 4$ et des homotrimères $(\alpha 1)_3$ et $(\alpha 3)_3$ (HUDSON et al., 1993). Les isoformes pour les chaînes $\alpha 5$ ou $\alpha 6$ n'ont pas encore été décrites. Ces chaînes sont codées par six gènes, COL4A1-COL4A6, qui ont une organisation génomique tout à fait particulière, puisqu'ils sont regroupés deux par deux sur trois chromosomes; les chaînes $\alpha 1$ (IV) et $\alpha 2$ (IV) sur le chromosome 13, $\alpha 3$ (IV) et $\alpha 4$ (IV) sur le chromosome 2 et $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) sur le chromosome X. Chacune des paires de gènes présente la même organisation "tête-à-tête", avec une orientation transcriptionnelle inverse, les extrémités 5' de chacun des deux gènes étant séparées par moins de 500 paires de bases. La caractérisation de la structure primaire de ces chaînes a révélé des analogies importantes, en particulier au niveau du domaine NC1, qui permet de distribuer les chaînes en deux classes: *$\alpha 1$ -like*, comportant les chaînes $\alpha 1$, 3 et 5, et *$\alpha 2$ -like*, comportant les chaînes $\alpha 2$, 4 et 6. Cela suggère l'existence d'un

gène ancestral commun qui se serait d'abord dupliqué au même locus, puis ces deux gènes se seraient tripliqués sur deux autres chromosomes.

4.3 Distribution des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$

Le collagène classique (chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$) est un constituant ubiquitaire des lames basales alors que les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$ ont une distribution plus restreinte. Certains tissus synthétisent les six chaînes de collagène IV: soit les reins, les poumons, les muscles squelettiques, les méninges et le coeur (HEIDET et al., 1997). Il est intéressant de noter que les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$ sont toujours co-exprimées dans les mêmes tissus. Ces deux chaînes sont également exprimées au niveau des lames basales de l'oeil, de l'oreille et du cerveau (KLEPPEL et al., 1989). En revanche, les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont co-exprimées dans certains tissus (la peau et l'oesophage par exemple), mais pas dans tous: la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est exprimée dans le rein au niveau de la lame basale glomérulaire, ce qui n'est pas le cas de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ (NINOMIYA et al., 1995; PEISSEL et al., 1995). La chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est également exprimée au niveau du cerveau (ZHOU et al., 1994) et de l'oeil (KLEPPEL et MICHAEL, 1990).

4.4 Expression des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 5(\text{IV})$ au niveau de l'intestin grêle

Récemment, l'expression des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 5(\text{IV})$ a été analysée au niveau de l'intestin grêle (BEAULIEU et al., 1994), la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ n'étant pas encore identifiée. Les chaînes du collagène classique ($\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$) sont exprimées au

niveau des lames basales de tout l'épithélium et des éléments cellulaires de la lamina propria de l'intestin grêle foetal. Il n'est pas étonnant de détecter ces deux chaînes au niveau de l'intestin, vue leur expression ubiquitaire. Aucune modulation de l'expression de ces chaînes de collagène n'a été observée, suggérant ainsi pour ces molécules aucun rôle fondamental dans la régulation du développement et de la différenciation intestinale.

Cependant, les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ - $\alpha 5(\text{IV})$ étaient plus susceptibles de jouer un rôle dans le développement intestinal, étant donné leur distribution restreinte. Les chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ et $\alpha 4(\text{IV})$ ne sont pas détectées dans l'intestin grêle, ce qui est compatible avec la distribution restreinte des isoformes du collagène de type IV (KLEPPEL et al., 1989). Étonnamment, par immunofluorescence, un marquage de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ a été observé au niveau du domaine basolatéral des cellules épithéliales et dans le mésenchyme sous-jacent de l'intestin grêle foetal (18 semaines). Au niveau de l'intestin adulte, l'antigène de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ n'est que faiblement exprimé, tant au niveau de la lame basale que des éléments cellulaires de la lamina propria. La régulation négative de l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ au cours du développement de l'intestin a été confirmée par RT-PCR (BEAULIEU et al., 1994).

5- Pathologies associées au collagène de type IV

Des anomalies d'expression des chaînes du collagène IV peuvent avoir des conséquences graves, illustrant ainsi l'importance du collagène IV au niveau des lames basales.

5.1 Maladie de Goodpasture

La maladie de Goodpasture peut se déclarer chez les individus des deux sexes et de tout âge. Cependant elle se déclare le plus souvent au cours de la troisième décennie, mais avec un second pic d'incidence chez les patients de plus de cinquante ans (TURNER et REES, 1996).

Plus précisément, cette pathologie est une maladie autoimmune léthale qui se caractérise par une glomérulonéphrite et des hémorragies pulmonaires médiées par des anticorps ayant comme cibles les lames basales glomérulaires et alvéolaires (HUDSON et al., 1993). L'épitope des anticorps de la maladie de Goodpasture a été localisé à l'extrémité carboxyterminale du domaine NC1 de la chaîne $\alpha 3(IV)$, comprenant les trente-six derniers résidus comme site primaire d'interaction (HUDSON et al., 1993). L'initiateur de la synthèse d'autoanticorps n'est pas encore identifié, mais de solides évidences portent à croire à une prédisposition héréditaire.

5.2 Syndrome d'Alport et léiomyomatose oesophagienne diffuse

Le syndrome d'Alport (SA) est une affection héréditaire, généralement transmise par le mode dominant X-lié avec des symptômes plus sévères chez les hommes. Cette pathologie est caractérisée par l'association d'une néphropathie hématurique évoluant vers l'insuffisance rénale chronique, une surdité de perception et des lésions oculaires (WEBER et al., 1992; TRYGGVASON et al.,

1993). La néphropathie est caractérisée par des anomalies ultrastructurales des membranes basales glomérulaires (HINGLAIS et al., 1972; SPEAR et SLUSSER, 1972). Ces anomalies des lames basales glomérulaires proviennent des mutations (plus de 200 mutations différentes) du gène COL4A5 (TRYGGVASON et al., 1990; ANTIGNAC et al., 1994; HEIKKILÄ et SOININEN, 1996; KNEBELMANN et al., 1996; RENIERI et al., 1996). Chez environ les deux tiers des patients masculins atteints du SA, les chaînes $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont absentes des membranes basales rénales. Ces constatations ont fait suggérer qu'une anomalie de conformation de la chaîne $\alpha 5$ du collagène IV peut empêcher l'intégration normale des chaînes $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ dans le réseau de collagène IV (KASHTAN et al., 1996). De plus, la surexpression des chaînes $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$, observée dans les membranes basales glomérulaires, supporte les études suggérant que les chaînes $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ forment un réseau collagénique indépendant de celui des chaînes $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})$.

Dans le cas du SA récessif autosomique, encore plus rare, ce sont les mutations du gène COL4A3 ou COL4A4 qui sont responsables de la pathologie. Dans ce cas, les altérations ultrastructurales des lames basales sont identiques à celles observées dans la forme liée à l'X et la gravité de la maladie est identique chez les garçons et les filles.

Certains patients atteints du SA peuvent également développer la léiomyomatose oesophagienne diffuse (LOD). La LOD est une affection tumorale rare causée par la prolifération bénigne des cellules musculaires lisses, ayant pour

conséquence l'épaississement diffus de la paroi de l'oesophage. La dysphagie et des vomissements à répétition sont les symptômes qui apparaissent dès l'enfance et mènent généralement à une oesophagectomie chirurgicale. D'un aspect moléculaire, les patients atteints de la LOD présentent une délétion en 5' du gène COL4A5 (sur une plus ou moins grande étendue) qui se poursuit en emportant les deux premiers exons du gène COL4A6 et se termine toujours dans une région assez bien définie au niveau du deuxième intron du gène COL4A6 (ZHOU et al., 1993). Les patients atteints du SA ne présentent pas nécessairement les symptômes de la LOD, alors que les patients atteints de la LOD ont nécessairement le SA.

Les fonctions des chaînes à expression restreinte ($\alpha 3(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$), autres que structurales, sont encore inconnues. Cependant, leur implication pathologique (maladie de Goodpasture, SA et LOD) fournit de nouveaux indices sur la structure et les propriétés des lames basales spécialisées. Les mutations causant le SA et la LOD ainsi que la distribution tissulaire limitée des chaînes correspondantes, indiquent clairement des fonctions biologiques spécifiques pour ces chaînes, incluant un rôle vital dans la fonction de tamis moléculaire des lames basales glomérulaires et dans la différenciation cellulaire, dont celle des muscles lisses.

6- Objectifs du projet de maîtrise

Suite aux études préliminaires menées sur l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ au cours du développement de l'intestin humain, à la récente identification de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ et à l'absence de rôle fonctionnel attribué à ces deux chaînes de collagène IV, les objectifs de mon projet de maîtrise se définissent comme suit:

- Étudier l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ au cours du développement de l'intestin grêle et de la différenciation des cellules Caco-2/15.
- Déterminer si la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ est synthétisée au niveau de l'intestin grêle humain. Et si c'est le cas, étudier son expression au cours du développement intestinal et de la différenciation des cellules Caco-2/15.
- Étudier l'origine cellulaire et la déposition, au niveau de la lame basale intestinale des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ du collagène de type IV.
- Étudier les rôles fonctionnels qu'exercent les chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV au niveau de l'intestin.

II. MATÉRIEL ET MÉTHODES

1- Spécimens

1.1 Tissus foetaux et adultes humains

Les intestins grêles de région proximale ont été obtenus de foetus humains âgés de douze à vingt semaines de gestation. Les avortements légaux ont été effectués par la méthode de succion et de curetage. L'âge des foetus a été déterminé en se basant sur le dossier médical ou l'échographie. Les intestins adultes ont été obtenus d'interventions chirurgicales. Les tissus normaux provenaient des marges de résection. L'utilisation du matériel humain était approuvée par le Comité de déontologie institutionnel.

1.2 Isolement des cellules épithéliales et mésenchymateuses d'intestin grêle foetal humain par Matrisperse

La dissociation de l'épithélium du mésenchyme des intestins foetaux est une méthode qui a été mise au point dans notre laboratoire (PERREAULT et al., en préparation). Des échantillons purs de cellules épithéliales et mésenchymateuses ont été obtenus suite à un traitement au Matrisperse (Collaborative Biomedical Products), un produit commercialisé pour isoler les cellules cultivées sur le Matrigel, une matrice composée principalement de laminine et de collagène. Pour obtenir la dissociation complète de l'épithélium du mésenchyme, les intestins grêles de foetus

âgés entre 15 et 20 semaines de gestation ont été ouverts longitudinalement puis fragmentés en petits morceaux (5 X 5 mm²). Les fragments ont été déposés dans 5 ml de Matrisperse et incubés, avec agitation, à 4°C (8 à 10 heures) dans des pétris de plastique de 100 mm (Falcon, Becton-Dickenson Labware) (8-12 fragments/pétri). La suspension cellulaire contenant les cellules épithéliales a délicatement été prélevée sans perturber le tissu mésenchymateux et a été centrifugée, pendant 7 minutes, à 100 x g dans une centrifugeuse de type IEC PR-J (Damon). Le tissu mésenchymateux a été retiré du Matrisperse et chaque fragment a délicatement été lavé avec une saline tamponnée aux ions phosphate (PBS) pour éliminer les cellules épithéliales encore présente. Afin de permettre l'analyse des protéines et ARNs des cellules épithéliales et mésenchymateuses, l'extraction des protéines (section 4) et ARNs (section 5) a ensuite été effectuée.

2- Culture de cellules

2.1 Cellules Caco-2/15

La lignée cellulaire Caco-2/15 nous a été fournie par le Dr. A. Quaroni (Cornell University, Ithaca, N.Y.). Ce clone est dérivé de la lignée parentale Caco-2 (HTB 37; American Type Culture Collection, Rockville, MD, U.S.A.) et a été caractérisé précédemment (BEAULIEU et QUARONI, 1991; VACHON et BEAULIEU, 1992; VACHON et al., 1993). Cette lignées cellulaire a été isolée d'un adénocarcinome de côlon humain et est reconnue pour se comporter comme des cellules entérocytaires d'intestin grêle foetal (BEAULIEU et QUARONI, 1991;

VACHON et BEAULIEU, 1992; VACHON et al., 1993). Cette lignée cellulaire est la seule lignée intestinale humaine ayant la capacité de se différencier en culture, mimant ainsi la différenciation des entérocytes le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin. Les cellules ont été cultivées dans des pétris de plastique de 100 mm (Falcon, Becton-Dickenson Labware) à 37°C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂, avec du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM), contenant 10% de sérum de veau foetal ICN CELlect Gold (ICN Biomedicals), 10 mM d'Hepes et 2 mM de glutamine (tous provenant de GIBCO/BRL, Burlington, Ont.) .Les milieux ont été changés toutes les quarante-huit heures en ajoutant 10 ml de milieu frais et les cellules étaient passées lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence. Tel qu'indiqué au fur et à mesure, les cellules ont été utilisées à différents stades de confluence, dépendamment des besoins.

2.2 Cellules épithéliales intestinales humaines (HIEC)

Les cellules HIEC ont été isolées dans notre laboratoire (PERREAULT et BEAULIEU, 1996). La procédure consistait à isoler les cellules épithéliales d'intestins grêles obtenus de foetus humains âgés de dix-sept à dix-neuf semaines de gestation, en traitant les morceaux d'intestin à la thermolysine (protéase de type X) 0,005% (Sigma Chemical Co). Suite au traitement à la thermolysine, le surnageant a été récupéré et les cellules épithéliales ont été mises en culture. La population pure de cellules épithéliales ainsi isolées a été cultivée dans des pétris de plastique de 100 mm, à 37°C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂, avec du DMEM contenant 5% de sérum de veau foetal, 5 ng/ml de facteur de croissance

épidermique humain (hEGF) (Boehringer Mannheim), 0.2 UI/ml d'insuline humaine (Connaught Novo Laboratories), 50 U/ml de pénicilline, 50 U/ml de streptomycine, 10 mM d'Hepes et 2 mM de glutamine. Les milieux étaient changés trois fois par semaine en ajoutant 10 ml de milieu frais et les cellules étaient passées, une dans deux, à l'atteinte de la confluence. Les cellules utilisées dans les expériences étaient à différents temps de confluence, entre les passages 4 et 16.

2.3 Cellules mésenchymateuses intestinales humaines (HIM)

Ces cellules ont été isolées du mésenchyme d'un intestin foetal humain de dix-huit semaines (VACHON et al., 1993). Des explants de jéjunums ont été digérés partiellement, à l'aide de trypsine (0.5% trypsine-0.54 mM EDTA dans du PBS sans Ca^{2+} et Mg^{2+}), deux fois dix minutes à 23°C. Les fragments ont été récupérés et mis en culture selon les mêmes conditions que pour les cellules Caco-2/15 (section 2.1). On a ainsi obtenu une population pure de cellules mésenchymateuses. Les milieux étaient changés toutes les quarante-huit heures en ajoutant 10 ml de milieu frais et les cellules étaient passées lorsqu'elles atteignaient 80% de confluence. Les cellules utilisées dans les expériences étaient à différents temps de confluence, dépendamment des besoins.

2.4 Co-culture

Afin d'obtenir les co-cultures, les cellules Caco-2/15 ont étéensemencées à haute densité (1×10^7 cellules) sur des cellules HIM à deux jours post-confluence.

Les cellules ont été conservées jusqu'à six jours, en renouvelant le milieu aux quarante-huit heures. Le milieu et les conditions de cultures étaient les mêmes que pour les cellules Caco-2/15 (section 2.1).

3- Localisation des chaînes du collagène IV par immunofluorescence indirecte

3.1 Préparation des spécimens

3.1.1 Co-culture

Les co-cultures ont été cultivées, puis incluses dans un milieu d'enrobage pour échantillons de tissus à congeler (Optimum Cutting Temperature; Tissue Teck, Miles Laboratories) et rapidement congelées dans l'azote liquide. Les blocs étaient conservés à -80°C (BEAULIEU et al., 1990; BEAULIEU et al., 1991).

3.1.2 Tissus humains

Les intestins grêles foetaux et adultes étaient conservés intacts. Les segments, d'environ un cm de long, ont été lavés dans du PBS, asséchés, inclus dans le milieu d'enrobage puis rapidement congelés dans l'azote liquide. Les blocs étaient conservés à -80°C.

3.2 Coupes de tissus

Les tissus utilisés étaient des jéjunums obtenus de foetus humains âgés de douze à vingt semaines de gestation ainsi que des jéjunums obtenus d'adultes sains. De ces tissus, nous avons effectué des coupes de 3 μm d'épaisseur, à l'aide d'un cryostat de type Jung Frigocut 2800N (Leica Instrument). Les coupes ont été déposées sur des lames de verre préalablement traitées à la poly-L-lysine (Sigma), pour l'utilisation des anticorps dirigés contre les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, ou au silane (Sigma), pour l'utilisation des autres anticorps, et placées à 37°C pendant une heure. Les coupes ont été conservées à -80°C.

3.3 Procédure d'immunofluorescence indirecte

Les coupes de tissus, conservées à -80°C, ont été équilibrées une heure à la température de la pièce. Les spécimens ont été fixés pendant cinq minutes à 4°C avec de l'éthanol (95%) froid, puis rincés au PBS. Pour la détection des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, les coupes ont été dénaturées une heure à 4°C dans une solution urée 6 M, glycine-HCl 0,1 M, pH 3,5. Les spécimens ont ensuite été lavés, trois fois cinq minutes, avec du PBS, à la température de la pièce. Puis les lames ont été incubées quarante-cinq minutes, à 4°C, dans une solution de PBS contenant 100 mM de glycine. Ensuite, trois lavages de dix minutes au PBS ont été effectués (BEAULIEU et al., 1991; BEAULIEU, 1992; VACHON et al., 1993; BEAULIEU et al., 1993).

Les coupes de tissus ont été bloqués (pour empêcher la liaison non-spécifique de l'anticorps), pendant une heure, avec une solution de 10% de lait en poudre écrémé dans du PBS (Blotto 10%), préalablement centrifugée. Seule exception, lors de l'utilisation de l'anticorps contre la chaîne $\alpha 6(IV)$, l'agent bloquant était une solution de 2% d'albumine de sérum bovin (Sigma Chemical Co). Puis, deux lavages de cinq minutes avec du PBS ont été effectués. Il est à noter que l'étape de blocage ainsi que les étapes avec les anticorps primaires et secondaires ont été effectuées dans une chambre à humidité à la température de la pièce.

Pour la réaction d'immunofluorescence, les différents anticorps primaires (énumérés au tableau 1), dilués dans leur agent bloquant, ont été déposés sur les coupes, à raison de 50 μ l par coupe, et incubés pendant une heure. De nouveau, trois lavages de dix minutes au PBS ont été effectués. Ensuite, l'anticorps secondaire, un anticorps de chèvre (fragment F(ab')₂) anti-immunoglobuline de lapin ou de souris pour CY-90 conjugué à la fluorescéine (Boehringer Mannheim), a été ajouté de la même façon que pour l'anticorps primaire. Les lames ont été incubées pendant une heure à la température de la pièce et à l'abri de la lumière. Après trois lavages de dix minutes et une coloration de trente secondes au bleu d'Évans (0,01% dans du PBS), les lames ont été montées avec un mélange glycérol-PBS 9:1 contenant 10 μ g/ml de paraphényldiamine. Les observations ont été effectuées sur un microscope à fluorescence de type Reichert Polyvar 2 (Leica Instrument). Les photographies ont été prises sur film de type Tri-X Pan 400 ASA (Kodak).

Tableau 1. Liste des anticorps primaires utilisés pour l'immunofluorescence indirecte et pour la détection des antigènes dans l'analyse Western

NOM	TYPE	ANTIGÈNE	DILUTION	SOURCE	MÉTHODE
CY-90	Mab/S	Kératine 18	1/1000	Sigma (LEVY et al., 1988)	AW
AB748	Pab/L	$\alpha 1(IV), \alpha 2(IV)$	1/800	Chemicon Int., El secondo, CA	IF
Anti-Lacl	Pab/L	Répresseur Lacl	1/1000	Stratagene	AW
Caco 3/73 (HSI 14)	Mab/S	Sucrase- Isomaltase	1/5	Dr. A. Quaroni (BEAULIEU et al., 1989)	AW
Anti- $\alpha 5(IV)$ J-2	Pab/L	$\alpha 5(IV)$	1/500 1/300	Dr. J.-F. Beaulieu (BEAULIEU et al., 1994)	IF AW
Anti- $\alpha 6(IV)$	Pab/L	$\alpha 6(IV)$	1/200 1/500	Dr. J. Zhou (Peissel et al., 1995)	IF AW

Légende: Mab/S -> Anticorps monoclonal de souris

Pab/L -> Anticorps polyclonal de lapin

AW -> Analyse Western

IF -> Immunofluorescence indirecte

4- Étude de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ par transfert Western

4.1 Préparation des échantillons

4.1.1 Les cellules Caco-2/15, HIEC et HIM

Les cellules ont été cultivées dans des pétris de 100 mm, le milieu aspiré puis les cellules rincées trois fois avec du PBS. Nous avons ajouté 1 ml de tampon de solubilisation (tampon Tris-HCl 0,125 M pH 6,8; 0,23% de sodium dodécyl sulfate (SDS); 10% de glycérol; 0,001% de bleu bromophénol; 5% de β -mercaptoéthanol) aux pétris et les cellules ont été grattées. Afin de libérer les protéines, les cellules ont été soniquées trois fois avec un sonicateur de type Ultrasonic Processor XL (Mandel Scientific Compagny Ltd) pendant dix secondes, à intensité 4. Les échantillons ont été chauffés pendant cinq minutes à 100°C avec agitation régulière, puis centrifugés à 13 000 rpm cinq minutes dans une microfuge de type Biofuge A (Baxter, Canlab). Les surnageants ont été récupérés et conservés à -80°C.

4.1.2 Les cellules épithéliales et mésenchymateuses isolées par Matrisperse

Les cellules épithéliales récupérées suite à leur dissociation du mésenchyme ont été centrifugées à 100 x g pendant sept minutes dans une centrifugeuse de type IEC PR-J (Damon) et le surnageant a été éliminé. Au culot, le tampon de solubilisation a été ajouté et les cellules ont été soniquées. Le mésenchyme a été

lavé deux fois cinq minutes au PBS, déposé dans du tampon de solubilisation, puis soniqué. Les étapes suivantes étaient les mêmes que pour la préparation des lysats protéiques des cellules (section 4.1.1).

4.2 Séparation des protéines sur gel de polyacrylamide dénaturant

Les gels utilisés étaient de type Laemmli (LAEMMLI, 1970), mais l'acrylamide du gel de séparation était de type Thomas et Kornberg (THOMAS et KORNBERG, 1975) (rapport acrylamide : bis-acrylamide 30:0,15).

Tableau 2. Composition des gels d'acrylamide utilisés

PRODUITS	GEL D'ENTASSEMENT	GEL DE SÉPARATION	
		(10%)	(15%)
Acrylamide 30:0,15	33,25%	47,5%
Acrylamide/Bis 30% (BioRad)	13,2%
Tampon tris 1,5M pH 8,8	50%	50%
Tampon tris 1,5M pH6,8	25,2%
Eau bidistillée	60%	15,25%	1,2%
SDS 10%	1%	1%	1%
Persulfate d'ammonium 10%	0,5%	0,25%	0,25%
Temed	0,1%	0,05%	0,05%

Tableau 3. Composition du tampon d'électrophorèse de type Thomas et Kornberg

PRODUITS	
SDS	0,1%
Glycine	2,88%
Tris-HCl	0,61%

4.3 Transfert des protéines sur membrane de nitrocellulose

Le gel a été récupéré et équilibré pendant trente minutes dans le tampon de transfert à 4°C (glycine 1,4%, Tris 0,3%, dans de l'eau bidistillée). Le gel, la membrane de nitrocellulose (BioRad) et le papier Whatman ont été montés en sandwich, puis les protéines du gel ont été transférées sur la membrane pendant environ une heure quinze à 100 V (avec le système BioRad). Après le transfert, les membranes récupérées ont été lavées deux fois cinq minutes dans de l'eau bidistillée. Les protéines ont été localisées par une coloration au Ponceau Rouge (TOWBIN et al., 1979), pour permettre de tailler les membranes et de localiser les marqueurs de poids moléculaires. Les membranes ont été complètement décolorées par des lavages au PBS.

4.4 Détection des antigènes

Les membranes de nitrocellulose ont d'abord été bloquées avec une solution de Blotto 10%, pendant deux heures à 37°C. Après le blocage, les membranes ont été incubées toute la nuit avec agitation, à la température de la pièce, avec leurs anticorps primaires (énumérés au tableau 1) dilués avec l'agent bloqueur. Cette incubation a été suivie de trois lavages de dix minutes dans du PBS avec 10%-Tween 20 puis de deux lavages de dix minutes dans du PBS. Les membranes ont ensuite été bloquées, une seconde fois, pendant une heure à la température de la pièce, avec agitation constante. Après, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-immunoglobuline de lapin ou de souris pour

CY-90 conjugué à la phosphatase alcaline (BioRad), pendant une heure avec agitation. Suivirent les lavages au PBS avec 10%-Tween 20 puis au PBS. Un dernier lavage de cinq minutes a été effectué avec le tampon pour la phosphatase alcaline (Tris 1,21 %; NaCl 0,58%; MgCl₂ 1,02%; pH 9,5; dans de l'eau bidistillée) (BEAULIEU et al., 1989; BEAULIEU et al., 1993; VACHON et al., 1993; BEAULIEU et VACHON, 1994).

La détection des sites marqués par les anticorps a été effectuée par l'incubation des membranes avec le réactif de la phosphatase alcaline (BioRad), dilué dans le tampon pour la phosphatase alcaline. La réaction a été arrêtée par le lavage des membranes dans de l'eau bidistillée et les membranes ont été séchées.

5- Extraction des ARNs

5.1 Préparation des spécimens

5.1.1 Intestins foetaux et adultes

Des segments d'intestins grêles et de côlons ont d'abord été ouverts longitudinalement et lavés rapidement avec du PBS. Ces tissus ont ensuite été coupés en morceaux d'environ 3 mm² et recueillis dans une solution monophasique de phénol et GIT (TRIzol reagent; Gibco/BRL), à raison de 1 ml par 50 mg de tissus. Ensuite les tissus ont été homogénéisés, sur glace, à l'aide d'un appareil de type Polytron (Brinkmann Instruments), au cinquième niveau pour une période d'environ

trente secondes. Une seconde étape d'homogénéisation (20-30 sec) a pu être effectuée lorsque la première étape ne suffisait pas pour obtenir une homogénéisation complète.

5.1.2 Cellules épithéliales et mésenchymateuses isolées par Matrisperse

Les cellules épithéliales récupérées suite à leur dissociation du mésenchyme ont été centrifugées à 100 x g pendant sept minutes, dans une centrifugeuse de type IEC PR-J (Damon) et le surnageant a été éliminé. Au culot, le TRIzol a été ajouté et les cellules ont été homogénéisées avec un appareil de type Polytron. Le mésenchyme a été lavé deux fois cinq minutes au PBS et a aussi été déposé dans du TRIzol, puis homogénéisé.

5.1.3 Cellules Caco-2/15, HIEC et HIM

Les cellules ont été cultivées dans des pétris de 100 mm et le milieu a été aspiré. Nous avons ajouté 8 ml de TRIzol (Gibco BRL) par pétri (8 ml de TRIzol par trois ou quatre pétris pour les cellules HIEC). Les cellules ont été grattées puis récupérées.

5.2 Extraction des ARNs totaux

Les extractions des ARNs totaux, par TRIzol (Gibco/BRL), ont été effectuées selon le protocole émis par son fabricant. Les tissus et cellules ont respectivement

été homogénéisés et lysés dans le TRIzol. Le TRIzol permet le maintien de l'intégrité de l'ARN pendant l'homogénéisation et la lyse des échantillons. Ensuite du chloroforme a été ajouté et les tubes ont été centrifugés, séparant ainsi la solution en une phase aqueuse et une phase organique. L'ARN demeure exclusivement dans la phase aqueuse. Après le transfert de la phase aqueuse, l'ARN a été récupéré par une précipitation à l'isopropanol, puis nettoyé à l'éthanol (75%).

Les extraits d'ARN ont alors été dosés par spectrophotométrie, à 260 nm, avec un appareil de type DU 640 (Beckman). La qualité des ARNs a été évaluée par la migration de 5 μ g d'ARN dans un tampon de migration (1/10 du volume initial) (0,25% bleu bromophénol, 0,25% xylène cyanol FF, 30% glycérol dans de l'eau bidistillée), sur un gel d'agarose 1%. La migration a été effectuée à 100 V pendant vingt minutes. Les ARNs ont été détectés par une coloration au bromure d'éthidium aux rayons U.V.

5.3 Extraction des ARNs poly(A)

Des ARNs extraits avec TRIzol (~ 1000 μ g) ont été utilisés pour en extraire les messagers. Le protocole expérimental suivi était celui émis par le fabricant. Brièvement, la technique du "PolyAtract mRNA Isolation System" de Promega (Fisher Scientific) utilise l'hybridation des queues polyA des ARNm avec un oligo(dT) biotinylé, lequel se couple avec un complexe Streptavidine-Sphère magnétique. Par magnétisme, les ARNm ont donc été extraits des ARNs totaux.

Les ARNm ont été dosés par spectrophotométrie, mais leur qualité n'a pas toujours été évaluée sur gel, étant donné la faible quantité d'ARNm ainsi obtenue.

6- Transfert Northern

6.1 Préparation et marquage des sondes

Afin d'étudier l'expression des transcrits des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, du répresseur LacI, de la sucrase-isomaltase et du GAPDH, des sondes spécifiques pour ces molécules ont été préparées.

La sonde $\alpha 5(\text{IV})$ (419 pb) a été obtenue par RT-PCR à partir de l'ARN total des cellules Caco-2/15 (sections 7.1 et 7.2) et a été clonée dans le vecteur d'expression pGem-T. Les enzymes de restriction *SacII* et *Sall* (Pharmacia) ont été utilisés pour l'isoler. La sonde $\alpha 6(\text{IV})$ (1455 pb) a été obtenue par PCR, à partir du clone JZK3 de lamda gt10 (ZHOU et al., 1993) (sections 7.1 et 7.2). Ce clone et les amorces nous ont été fournis par le Dr. J. Zhou. La sonde a ensuite été clonée dans le vecteur pGem-T et a aussi été isolée par la digestion avec les enzymes *SacII* et *Sall* (Pharmacia). La sonde du répresseur Lac I (1128 pb) a été obtenue par la digestion du vecteur p3'SS (obtenue du Dr. C. Asselin) avec l'enzyme de restriction *NarI* (Pharmacia). La sonde pSI₂ de la sucrase-isomaltase a été obtenue du Dr. Swallow (GREEN et al., 1987). Cette sonde de 2040 pb était clonée dans le vecteur pSP72 et a été obtenue par digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI* (Pharmacia). Finalement, la sonde GAPDH nous a été fournie par le Dr. C. Asselin.

Elle avait été clonée dans le vecteur pBlue Script et a été isolée par digestion avec l'enzyme de restriction *Pst*I (Pharmacia).

Les sondes ont été marquées au [α -³²P]dCTP (10 mCi/ml, Amersham) par extension d'amorces (Multiprime Kit, Amersham), puis nettoyées sur une colonne de G50.

6.2 Séparation des ARNs sur gel d'agarose

6.2.1 Préparation des échantillons d'ARN

Chaque échantillon a été préparé dans un volume final de 40 μ l. Ces échantillons contenaient 35 μ g d'ARN, 14,29% de tampon d'échantillon d'ARN (64,5% formamide déionisée, 22,58% formaldéhyde 37%, 12,90% tampon d'acide sulfonique 3-[N-morpholino]propane 10X (MOPS 10X) et 57,14% de tampon d'électrophorèse (50% glycérol, 1 mM EDTA, 0,4% bleu bromophénol, 1 μ g/ml bromure d'éthidium). Les échantillons d'ARN ont ensuite été dénaturés à 68°C, pendant quinze minutes. Puis ils ont immédiatement été déposés sur glace et migrés sur gel d'agarose.

6.2.2 Préparation de gel d'agarose

L'appareil Northern pour la migration (BioRad) a été lavé rigoureusement. Puis un gel d'agarose 1% avec 10% de MOPS 10X (200 mM MOPS acide, 50 mM

acétate de sodium, 7 mM EDTA, pH7,0) et 5% de formaldéhyde 37% (ajouté lorsque le gel avait refroidi à 50°C) a été coulé. Le gel polymérisé a été placé sur l'appareil de migration, rempli de tampon MOPS 1X. Les échantillons d'ARN ont été déposés dans les puits et migrés à 28 V pour la nuit.

6.3 Transfert des ARNs sur membrane de nylon

Les ARNs migrés ont été transférés par diffusion passive sur une membrane de nylon (Nytran, Schleicher et Schuell) (SAMBROOK et al., 1989). Le transfert a été effectué pendant quatre heures dans une solution de sel citrate sodium 20X (SSC 20X) (3 M NaCl, 0,3 M NaCitrates). Après le transfert, la membrane a été séchée à la température de la pièce, pendant trente minutes, et traitée aux rayons U.V. (0,2 J/cm²) avec un appareil de type IBI Ultralinker (Kodak).

6.4 Pré-hybridation, hybridation et détection des signaux radioactifs

Les membranes transférées ont d'abord été incubées à 65°C, pendant au moins une heure, dans une solution de pré-hybridation (120 mM Tris-HCl pH 7,4; 600 mM NaCl; 8 mM EDTA; 0,1% Na-pyrophosphate; 0,2% SDS; 0,06% héparine). Puis la solution de pré-hybridation a été remplacée par la solution d'hybridation (solution de pré-hybridation additionnée de 10% de dextran sulfate) contenant la sonde préalablement dénaturée pendant cinq minutes à 99°C. Les membranes ont ainsi été incubées à 68°C, pour la nuit. Ensuite les membranes ont été récupérées et lavées quatre fois à la température de la pièce avec 400 ml d'une

solution SSC 2X et SDS 1%. Les membranes ont été lavées une cinquième fois à 65°C, pendant trente minutes. Après, un lavage de trente minutes a été effectué à 65°C dans une solution SSC 0,1X et SDS 0,2%. Un dernier lavage de trente minutes à 50°C a été effectué dans une solution SSC 0,1X et SDS 0,1%. Afin de détecter les signaux radioactifs, les membranes ont été exposées à -80°C avec des films à autoradiographie XAR5 ou Biomax MS (Kodak). Les signaux ont été quantifiés par densitométrie à l'aide d'un Ultrosan (Pharmacia LKB XL) et normalisés par rapport au contrôle constitutif GAPDH.

7- Étude RT-PCR de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ par rapport au S14

7.1 Réaction de transcription inverse

La réaction de transcription inverse a été effectuée à partir des ARNs totaux des cellules Caco-2/15 (à différents stades de confluence), HIEC, HIM et des cellules épithéliales et mésenchymateuses isolées par Matrisperse. Tout d'abord, 0,5 μg d'oligo(dT) (Pharmacia) a été ajouté à 5 μg d'ARN total, dans un volume final de 12 μl . Pour permettre l'hybridation des oligo(dT) avec les queues poly(A), les tubes ont été incubés, dix minutes, à 70°C dans un appareil à cycle thermal (Perkin-Elmer DNA Thermal cycle model 480). À cette réaction, 4 μl de tampon de réaction 5X (Gibco/BRL), 2 μl de DTT 0,1 M et 1 μl d'un mélange de dNTPs 10 mM (10 mM de chacun d'ATP, dGTP, dCTP et dTTP) ont été ajoutés. Les tubes ont été mélangés et incubés à 42°C, pendant deux minutes. Puis, 200 unités de l'enzyme Super ScriptTMII (Gibco/BRL) ont été ajoutées, suivi d'une incubation de cinquante

minutes à 42°C, pour permettre la transcription inverse des ARNs. Finalement, la réaction a été arrêtée en incubant les tubes quinze minutes à 70°C. L'ADNc ainsi obtenu a été utilisé pour la réaction de polymérisation.

7.2 Réaction de polymérisation (PCR)

Les réactions d'amplification par PCR ont été effectuées à partir de 2 μ l de la réaction de transcription inverse. À ces extraits, 98 μ l d'un tampon de réaction de PCR, composé d'un tampon 10X (15 mM MgCl₂; 200 mM Tris-HCl, pH8,5; 500 mM HCl et 1% Tween-20), 100 picomoles de chacune des amorces sens et anti-sens, 2 mM de dNTPs, 2,5 unités de l'Amplitaq polymérase (Roche) et 50 μ Ci de [α -³²P]dCTP ont été ajoutés. La séquence des amorces et les conditions utilisées pour les réactions de PCR sont décrites aux tableaux 4 et 5, respectivement.

Tableau 4 . Séquences des amorces utilisées pour la réaction de polymérisation

Cible	Amorce sens	Amorce anti-sens
α 5(IV)	5'CTTCCTGGATTTCCAGGGAC3'	5'CCCTGAAGACCTTGCTCACC3'
α 6(IV)	5'CTTATGGAAAGCCATGTGGG3'	5'CGGACCTTCCGGATACTCTG3'
Protéine ribosomale S14	5'GGCAGACCGAGATGAATCCTCA3'	5'CAGGTCCAGGGGTCTTGGTCC3'

Tableau 5. Conditions d'amplification

Cible	Dénaturation	Hybridation	Extension	Nb. de cycles
$\alpha 5$ (IV)	1min. à 94°C	1min. à 63°C	1min. à 72°C	25
$\alpha 6$ (IV)	1min. à 94°C	1min. à 60°C	1.5min. à 72°C	25
Protéine ribosomale S14	30 sec. à 94°C	30 sec. à 63°C	30sec. à 72°C	18

7.3 Migration des échantillons de RT-PCR

Les échantillons amplifiés par PCR ont été migrés sur des gels de polyacrylamide 5% (Acrylamide/Bis 30%, BioRad) avec 20% de tampon Tris-borate/EDTA 5X (TBE 5X) (0,4 M Tris base; 0,4 M acide borique; 10 mM EDTA pH 8,0), 0,035% de Temed et 0,7% d'ammonium persulfate. À 10 μ l des réactions de PCR, 2 μ l de tampon de migration ont été ajoutés et les échantillons ont été migrés, pendant trois à quatre heures, à 100 V dans un tampon TBE 1X. Après la migration, les gels ont été démontés et transférés sur un papier Whatman pour être séchés, pendant une heure trente, à 65°C dans un séchoir de type Gel Dryer (Savant). Enfin, les signaux radioactifs ont été détectés avec des films d'autoradiographie XAR5 ou Biomax MR (Kodak), à la température de la pièce. Les signaux ont été quantifiés par densitométrie à l'aide d'un Ultroscan (Pharmacia) et normalisés par rapport au contrôle constitutif S14.

8- Inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ (IV) via le système inductible LacSwitch

Le système inductible LacSwitch (Statagene) nécessite la transfection successive des vecteurs p3'SS et pOPRSVICOL4A5 pour permettre l'expression régulée de l'ARN anti-sens de la chaîne $\alpha 5$ (IV). Le fonctionnement du système est illustré d'une façon plus détaillée à la figure 1.

8.1 Clonage de l'ADNc anti-sens de la chaîne $\alpha 5$ (IV) dans le vecteur pOPRSVICAT

L'objectif de ce clonage était d'insérer un ADNc, spécifique à la chaîne $\alpha 5$ (IV), avec une orientation anti-sens, à l'emplacement du gène CAT, dans le vecteur pOPRSVICAT (6243 pb). La procédure générale de ce clonage est illustrée à la figure 2.

8.1.1 Préparation du vecteur pOPRSVICAT pour le clonage de l'anti-sens de la chaîne $\alpha 5$ (IV)

Pour éliminer le gène CAT, le vecteur pOPRSVICAT a été digéré avec l'enzyme de restriction *NotI* (l'unique site de clonage de ce système) et l'enzyme a été inactivé vingt minutes à 65°C. Suite à la migration de la digestion sur un gel d'agarose (low melting) 1 %, le vecteur pOPRSVICAT linéarisé (5467 pb) a été isolé du gène CAT (776 pb) et purifié sur une mini-colonne avec la résine "PCR Preps" de "Wizard Purification System" (Promega). Puis le vecteur linéarisé a été déphosphorylé par l'enzyme CIAP (Pharmacia) et inactivé dix minutes à 75°C.

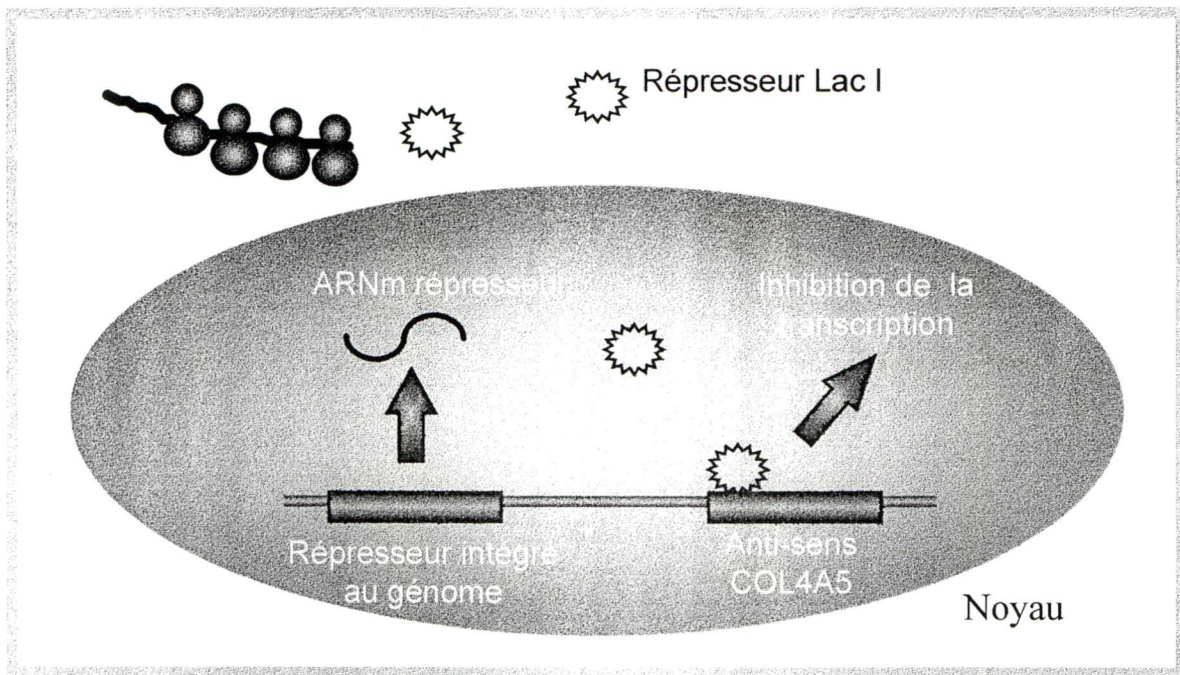
Figure 1. Fonctionnement du système inductible LacSwitch

Le système LacSwitch utilise plusieurs éléments modifiés de l'opéron lactose pour le contrôle de l'expression de gènes dans les cellules eucaryotes.

Les cellules transfectées, de façon stable, par les vecteurs p3'SS et pOPRSVICOL4A5 (ADNc COL4A5 inséré avec une orientation anti-sens) expriment le répresseur lac I qui, lorsque les cellules ne sont pas induites (A), se lie à l'opéron lactose, inhibant la transcription de l'anti-sens.

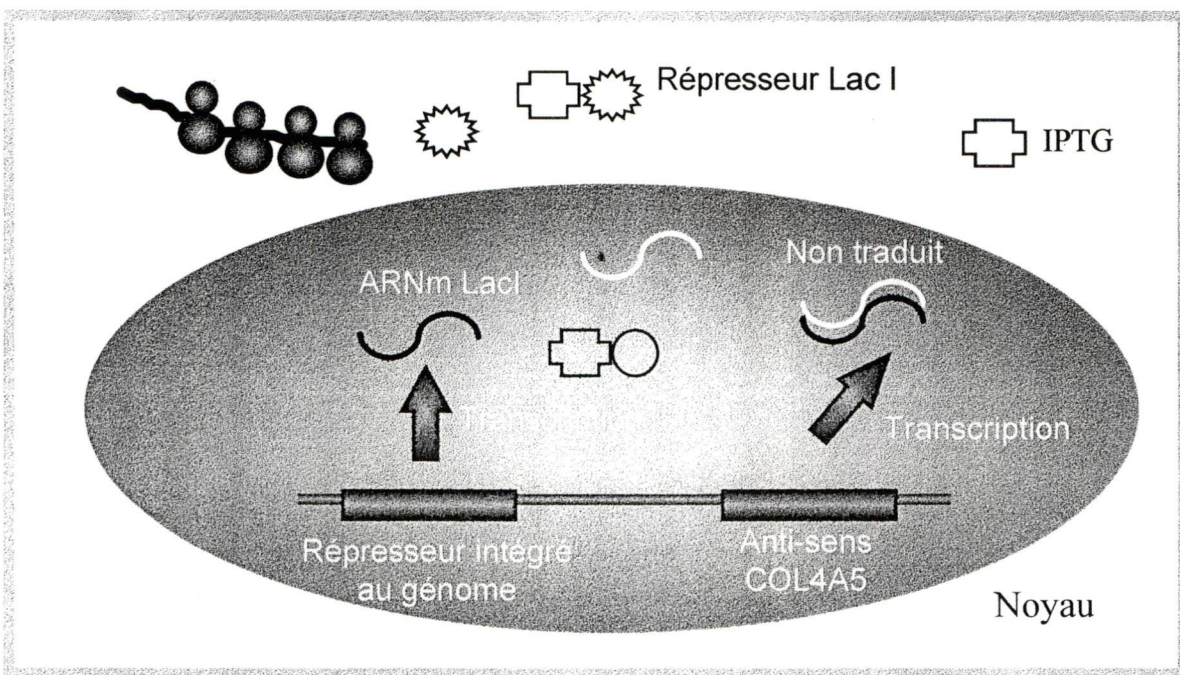
En présence de l'inducteur IPTG (B), celui-ci se lie au répresseur lac I changeant ainsi sa conformation. Le répresseur lac I ne peut donc plus lier son opérateur. La transcription de l'ADNc anti-sens COL4A5 est maintenant possible. Ces ARNm anti-sens forment ensuite des dimères avec l'ARNm endogène (ARNm COL4A5 sens). Ces dimères d'ARNm ne sont pas traduits, ce qui permettrait ainsi l'inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ du collagène IV par ces cellules.

A



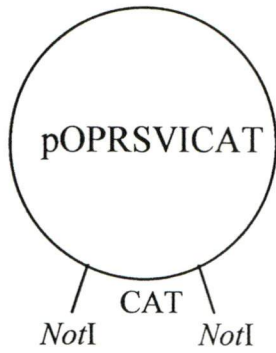
Cellule

B



Cellule

Figure 2. Procédure de clonage de l'ADNc COL4A5 dans le vecteur pOPRSVICAT



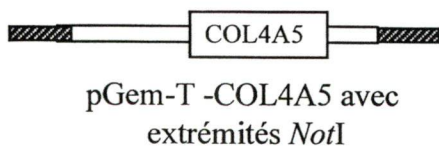
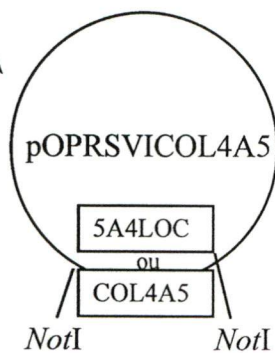
Digestion *NotI*

pOPRSVI avec extrémités *NotI*

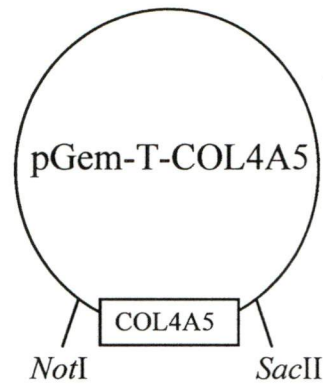
Déphosphorylation

pOPRSVI avec extrémités
NotI déphosphorylées

Ligation



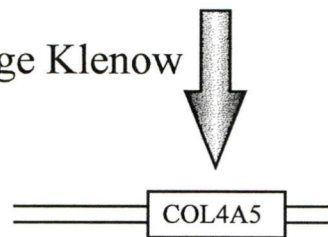
Digestion *NotI*



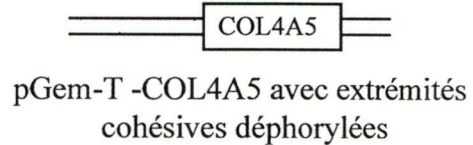
Digestion *SacII*



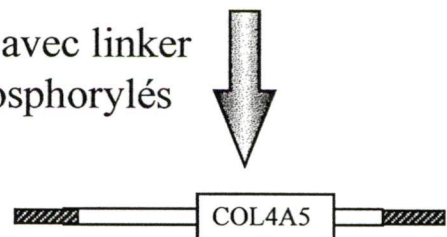
Remplissage Klenow



Déphosphorylation



Ligation avec linker
NotI phosphorylés



Finalement le vecteur a été purifié sur une mini-colonne avec la résine "clean up" de "Wizard Purification System" (Promega).

8.1.2 Préparation de l'anti-sens $\alpha 5(IV)$ pour son clonage dans le vecteur

pOPRSVI

La préparation de l'ADNc de la chaîne $\alpha 5(IV)$ a été effectuée de la façon suivante. Tout d'abord, le vecteur pGem-T, contenant cet ADNc, a été linéarisé avec l'enzyme de restriction *SacII* suivie de l'inactivation de cet enzyme pendant vingt minutes à 65°C. Ensuite, les extrémités 5' flanquantes ont été remplies avec le fragment "Klenow" de l'ADN polymérase I (Pharmacia) et le vecteur linéarisé a été purifié sur une mini-colonne avec la résine clean up. Puis le vecteur linéarisé a été déphosphorylé (de la même façon que pour le vecteur pOPRSVICAT) et ligué au linker *NotI* (12 pb) phosphorylé (Promega). La ligation a été effectuée selon le protocole établi par le fabricant.

Le produit de ligation a été transformé dans les bactéries JM 109 compétentes (Promega), selon le protocole de transformation émis par Promega. Finalement, une fraction des bactéries transformées a été inoculée sur des pétris d'agar 1,5% avec 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline, 0,1 mg/ml d'IPTG et 100 $\mu\text{g/ml}$ de X-Gal qui ont été incubés dans une chambre à 37°C, pendant la nuit. Une dizaine de colonies bleues ont été piquées et inoculées dans 5 ml de milieu LB avec 50 $\mu\text{g/ml}$ d'ampicilline puis incubées, avec agitation, pendant la nuit dans une chambre à 37°C. Pour chaque culture, les vecteurs ligués ont été extraits. Pour ce faire, nous

avons centrifugé 3 ml des cultures pendant deux minutes à 12 000 rpm dans une microcentrifugeuse de type Biofuge A et les culots ont été resuspendus avec 200 μ l de tampon de resuspension (100 μ g/ml RNase A; 50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; pH 8,0). Après, 200 μ l de tampon de lyse (200 mM NaOH; 1% SDS) ont été ajoutés suivi de 200 μ l de tampon de neutralisation (3,0 M Kac, pH 5,5). Les lysats ont été centrifugés pendant cinq minutes à 12 000 rpm. Ensuite le surnageant clair a été récupéré et purifié avec un volume de phénol/chloroforme puis avec un volume de chloroforme. Ensuite les vecteurs ont été précipités avec un volume d'isopropanol 100% et 1/10 de volume de sodium acétate 300mM, pendant une heure à -80°C. Les tubes ont été centrifugés dix minutes à 12 000rpm. Finalement, les culots ont été nettoyés avec un volume d'éthanol 75%, séchés à l'air et resuspendus avec de l'eau stérile. Afin de vérifier la ligation du linker *NotI*, les vecteurs ainsi isolés ont été digérés avec l'enzyme de restriction *NotI* (Pharmacia). Nous avons choisi un clone où la digestion avec l'enzyme *NotI* permettait d'isoler l'insert de la chaîne $\alpha 5$ (IV).

8.1.3 Ligation, transformation et extraction plasmidique

Pour cloner l'ADNc anti-sens de la chaîne $\alpha 5$ (IV) dans le vecteur pOPRSVI (sans le gène CAT), nous avons ligué le vecteur pOPRSVI linéaire déphosphorylé et l'ADNc de la chaîne $\alpha 5$ (IV) avec des extrémités *NotI*. Pour ce faire nous avons utilisé la procédure de ligation de Promega. Ensuite, le produit de ligation a été transformé dans les bactéries JM 109 compétentes (pétri sans IPTG et X-Gal) et extrait de la même façon que pour le clonage du linker *NotI* (section 8.1.2). Afin

de déterminer si l'insert était cloné avec une orientation anti-sens, les vecteurs isolés des colonies amplifiées ont été digérés avec l'enzyme de restriction *Pst*I. Nous avons ainsi obtenu des clones avec l'insert cloné dans les deux orientations (orientation sens: produits de digestion de 197 pb, 2396 pb et 3277 pb; orientation anti-sens: produits de digestion de 197 pb, 2022 pb et 3651 pb).

8.2 Transfection des cellules Caco-2/15 selon la méthode au phosphate de calcium

8.2.1 Transfection du vecteur p3'SS

Le vecteur p3'SS a été transfecté dans les cellules Caco-2/15 par la méthode au phosphate de calcium. La veille, les cellules étaient passées dans des pétris de 60 mm pour obtenir, le lendemain matin, des cellules à 40% de confluence. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu sans Hepes, trois heures avant la transfection. Pendant ce temps, le précipité était fait. Pour le préparer, 20 μ g du vecteur pOPRSVICOL4A5 et une concentration finale de 248 mM de CaCl_2 ont été ajoutés au tube 1. Le volume a été complété à 500 μ l avec de l'eau bidistillée stérile. Le tube 2 contenait 500 μ l de tampon HBS 2X (280 mM NaCl; 1,5 mM Na_2HPO_4 ; 50 mM HepesH 7,1). Pour permettre la formation des précipités, le contenu du tube 1 a été ajouté, 100 μ l à la fois, à celui du tube 2, en "vortexant" régulièrement. Cette solution a été incubée, pendant trente minutes, à la température de la pièce. Puis les cellules ont été lavées, pendant cinq minutes, avec du PBS. Ensuite 4 ml de milieu sans Hepes, le précipité et 50 μ g de chloroquine (pour inhiber le dégradation de l'ADN par les hydrolases lysosomales)

ont été ajoutés. Les cellules ont alors été incubées pendant quatre heures dans une atmosphère 97% air et 3% CO₂. Après, les cellules ont été lavées au PBS et 1,5 ml de glycérol 15% (dilué avec du tampon HBS 1X) a été ajouté, pendant trente secondes, pour augmenter l'efficacité de la transfection. Puis, les cellules ont été lavées au PBS et 5 ml de milieu ont été ajoutés, toujours sans Hepes. Les cellules ont alors été incubées, pendant la nuit, dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂. Le lendemain, le milieu a été changé pour du milieu normal. Quarante-huit heures après la transfection, 50 µg/ml d'hygromycine ont été ajoutés pour la sélection des cellules transfectées par le vecteur p3'SS. Les clones de cellules ainsi obtenus ont été isolés à l'aide de cylindres de clonage et les cellules ont été cultivées dans les mêmes conditions que les cellules Caco-2/15 non transfectées (section 2.1). Suite à cette amplification des clones, les cellules ont été récupérées pour en extraire l'ARN total (section 5) et pour préparer des lysats protéiques (section 4.1). Les ARNs et protéines de ces clones ont été utilisés pour analyser l'expression du répresseur LacI, de la sucrase-isomaltase et de la chaîne α5(IV) (seulement pour les protéines) par Northern (section 6) et Western blot (section 4).

8.2.2 Transfection du vecteur pOPRSVICOL4A5

Parmi les clones transfectés par le vecteur p3'SS, le clone 8 a été choisi, pour son expression considérable du répresseur LacI et de la sucrase-isomaltase, pour subir une seconde transfection. Donc, le clone 8 a été transfecté par le vecteur pOPRSVICOL4A5 par la méthode au phosphate de calcium (section 8.2.1). Cette fois, les cellules ont été sélectionnées avec 50 µg/ml d'hygromycine et 500

$\mu\text{g/ml}$ de généticine (Gibco/BRL). Les clones ainsi obtenus ont également été isolés avec les cylindres de clonage et amplifiés. Les clones ont ensuite été cultivés en duplicata où un des deux pétris de 100 mm était induit avec une concentration de 3 mM d'IPTG, jusqu'à 5 jours post-confluence. Finalement, les cellules ont été récupérées pour en extraire l'ARN total et comparer, par Northern (section 6) les niveaux d'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ entre les cellules contrôles et induites.

9- Inhibition de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ via le système inductible Tet-on

Le système inductible Tet-on (Clontech) nécessite, lui aussi, deux transfections successives pour permettre l'expression régulée de l'ARN anti-sens des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$. Le fonctionnement du système est illustré d'une façon plus détaillée à la figure 3.

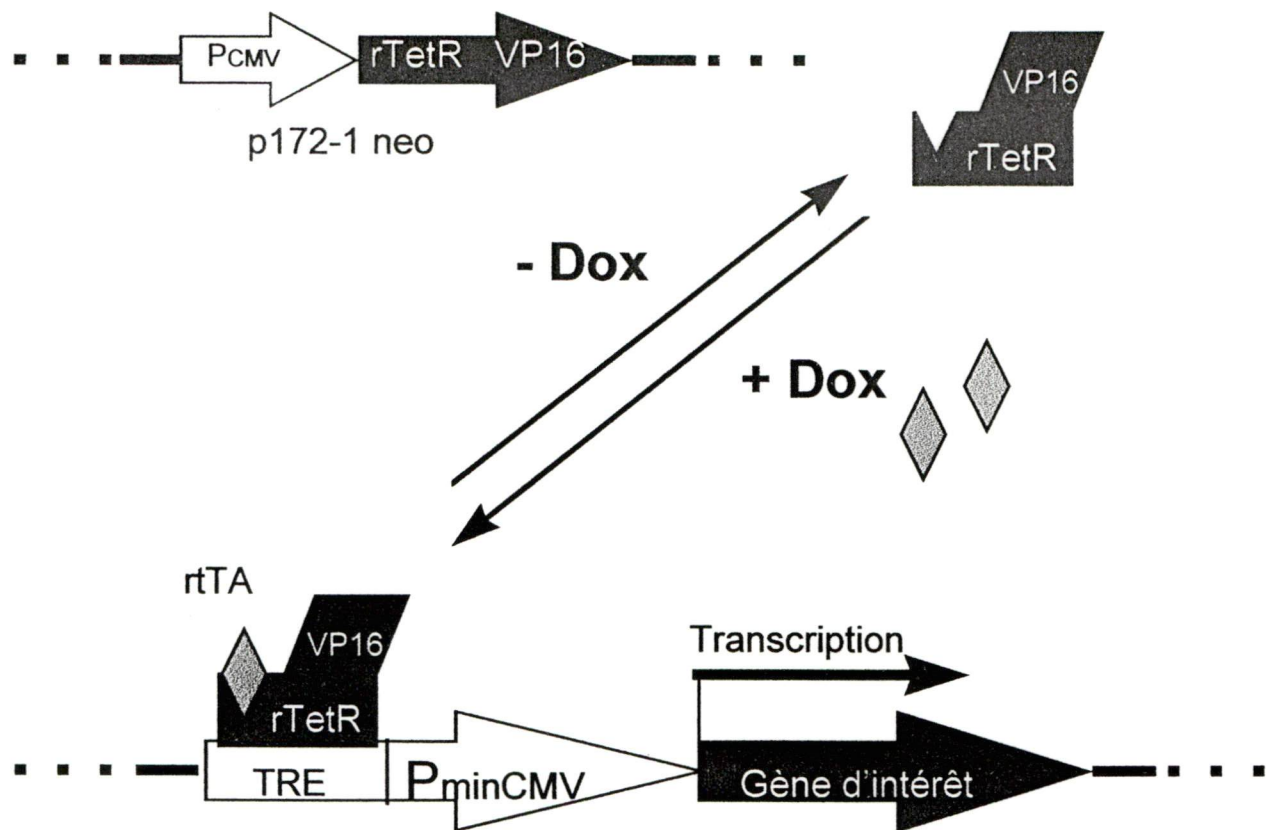
9.1 Transfection des cellules Caco-2/15 par le vecteur p172-1 neo selon la méthode à la lipofectamine

Le vecteur p172-1 neo a été transfecté dans les cellules Caco-2/15, avec la lipofectamine. La veille, les cellules ont été passées dans des pétris de 35 mm pour obtenir, le lendemain matin, des cellules à 40% de confluence. Pour la formation de complexes ADN-lipofectamine, 2 μg du vecteur p172-1 neo et 100 μl de milieu sans sérum ont été ajoutés dans un tube. Dans un second tube, 10

Figure 3. Fonctionnement du système inductible Tet-on

Le système Tet-on utilise les éléments de l'opéron tétracycline pour le contrôle de l'expression de gènes dans les cellules eucaryotes.

Les cellules transfectées, de façon stable, par les vecteur p172-1 neo et pUHD 10-3 (ou pUHC 13-3 pour l'expression de la luciférirase), expriment la protéine de fusion rTetR-VP16 de façon constitutive. VP16 est un activateur transcriptionnel répondant à la tétracycline alors que rTetR est le répresseur de la tétracycline. En présence de doxycycline (analogue plus puissant de la tétracycline), cette protéine de fusion lie l'opérateur de la tétracycline (TRE: tétracycline responsive element) activant ainsi le promoteur minimal de cytomégalovirus (P_{minCMV}) pour la transcription du gène d'intérêt (anti-sens COL4A5 ou COL4A6, luciférase). En absence de doxycycline, la protéine de fusion ne lie pas la séquence TRE.



Anti-sens: pUHD 10-3 (pour le
clonage des anti-sens)
Luciférase: pUHC 13-3

μ l de lipofectamine et 100 μ l de milieu sans sérum ont été ajoutés. Ensuite, le contenu des deux tubes a été mélangé et incubé pendant quarante-cinq minutes à la température de la pièce. Pendant ce temps, les cellules ont été rincées avec 2 ml de milieu sans sérum. Puis, 800 μ l de milieu sans sérum ont été ajoutés dans le tube contenant les complexes. Les complexes ont alors été appliqués directement sur les cellules et ces cellules ont été incubées, pendant cinq heures, à 37°C dans une atmosphère 95% air et 5% CO₂. Après cette incubation, 1 ml de milieu normal (contenant du sérum approuvé pour le système Tet; Clontech) a été ajouté, sans éliminer les complexes. Dix-huit heures après le début de la transfection, le milieu a été remplacé par du milieu frais et quarante-huit heures après la transfection, 200, 400 et 800 μ g/ml ou 1 200 μ g/ml de généticine ont été ajoutés pour la sélection. Les clones sélectionnés à 800 et 1 200 μ g/ml de généticine ont été isolés avec des cylindres de clonage et amplifiés de la même façon que pour les cellules transfectées par le vecteur p3'SS (section 8.2.1), alors que les cellules sélectionnées avec 200 et 400 μ g/ml ont été amplifiées sous forme de populations hétérogènes.

9.2 Analyse du taux d'inductibilité des cellules transfectées par le vecteur pUHC 13-3

Les clones et les populations hétérogènes transfectés par le vecteur p172-1 neo ont été transfectés, de façon transitoire, par le vecteur pUHC 13-3. Cette seconde transfection avait pour objectif d'analyser l'inductibilité à la doxycycline des cellules de la première transfection.

9.2.1 Transfection du vecteur pUHC 13-3 selon la méthode à la lipofectamine

La transfection à la lipofectamine a été effectuée selon la même procédure que celle employée pour la transfection du vecteur p172-1 neo (section 9.1). Cependant, la transfection a été effectuée en duplicata et 1 $\mu\text{g/ml}$ de doxycycline a été ajouté, après cinq heures d'incubation des cellules avec les complexes, dans un pétri de chaque duplicata.

9.2.2 Essais luciférase

Tout d'abord, le milieu a été éliminé et les pétris ont été lavés avec 1 ml de PBS en prenant soin d'éliminer tout le PBS. Ensuite, 100 μl de tampon de lyse 1X (Promega) ont été ajoutés aux pétris de 35 mm. Les pétris ont alors été incubés, pendant quinze minutes, à la température de la pièce en les agitant régulièrement. Ensuite, les cellules ont été gratt  es mécaniquement, r  cup  r  es dans des tubes de 1,5 ml et centrifug  es dix secondes (microfuge de type Biofuge A). L'activité luciférase a été dos  e avec un compteur à scintillation de type Cs-250 (Beckman) avec l'ajout de 100 μl du substrat luciférine (Promega)    une fraction du lysat r  cup  r  e (1 μl ou moins selon l'expression de base de la luciférine).

III. RÉSULTATS

1- Étude de la localisation des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV au cours du développement de l'intestin grêle humain

Afin de vérifier la localisation des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au cours du développement de l'intestin grêle humain, l'immunodétection de ces molécules a été effectuée sur des sections de jéjunums foetaux (12 et 19 semaines) (fig.4) et adultes (fig.5).

Des résultats préliminaires sur la localisation de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ dans l'intestin grêle ont déjà fait l'objet d'une publication (BEAULIEU et al., 1994).

1.1 Jéjunum foetal

À douze semaines de gestation, soit après l'initiation de la formation des villosités, les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ (fig.4A) et $\alpha 6(\text{IV})$ (fig.4B) sont exprimées au niveau du domaine basolatéral des cellules épithéliales, sur tout l'axe crypte-villosité. Aussi, les cellules mésenchymateuses de la lamina propria expriment fortement la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$, alors que l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ y est pratiquement négative.

À dix-neuf semaines de gestation, lorsque la structure intestinale s'apparente à celle de l'intestin grêle adulte (cryptes et villosités matures), les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ (fig.4C) et $\alpha 6(\text{IV})$ (fig.4D) présentent sensiblement le même patron d'expression

Figure 4. Immunodétection des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV dans le jéjunum d'intestin foetal

Les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ (A et C) et $\alpha 6(\text{IV})$ (B et D) ont été détectées par immunofluorescence indirecte sur des sections de jéjunums de 12 (A et B) et 19 semaines de gestation (C et D).

Grossissement:

A, B, C et D: 148X

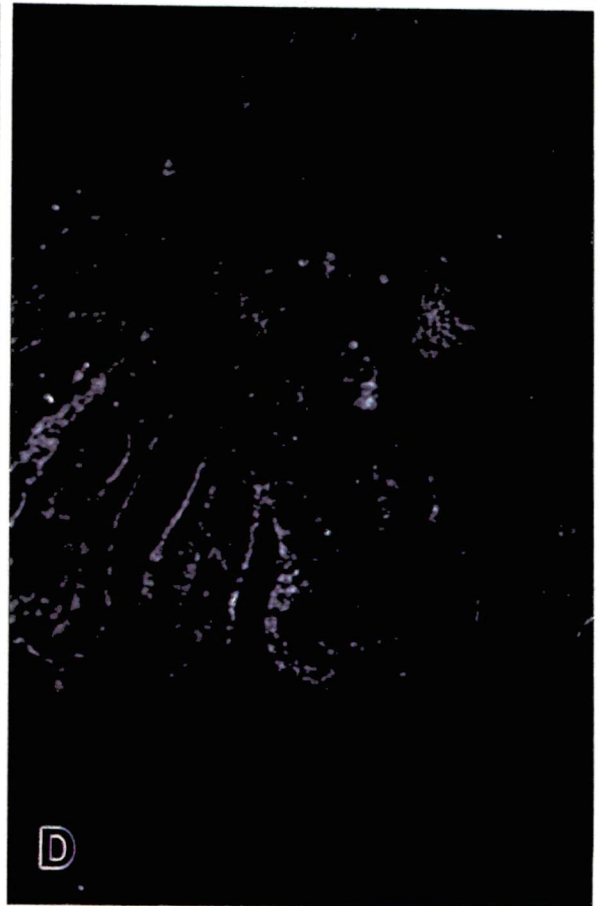
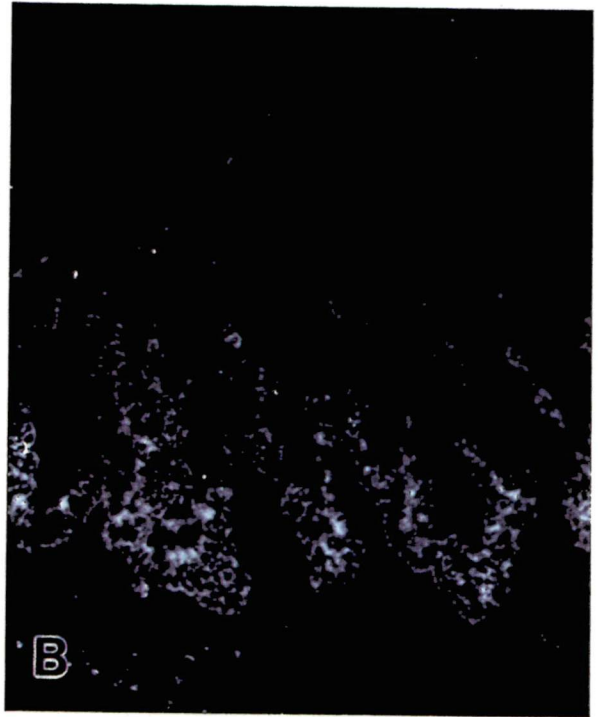
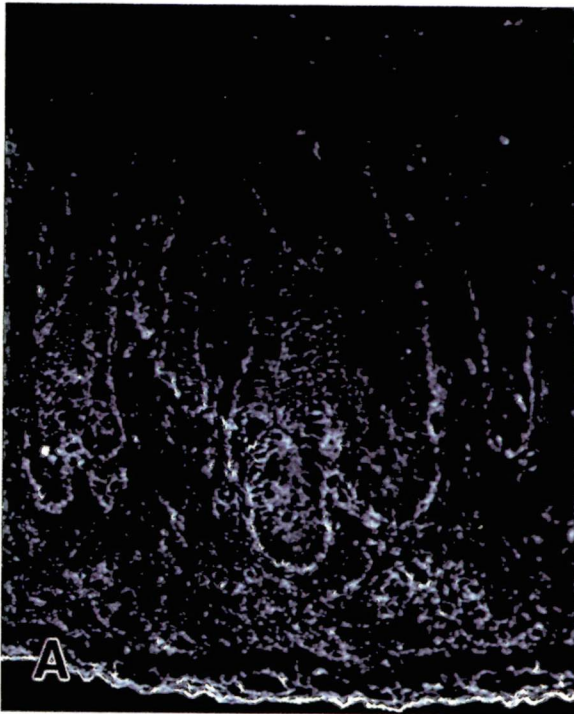


Figure 5. Immunodétection des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV dans le jéjunum d'intestin adulte

Les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ (A) et $\alpha 6(\text{IV})$ (B) ont été détectées par immunofluorescence indirecte sur des sections de jéjunums adultes (A et B).

Grossissement:

A et B: 148X



qu'au niveau du jéjunum de douze semaines de gestation. À ce stade du développement, la déposition des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au niveau de la lame basale est évidente.

1.2 Jéjunum adulte

À l'âge adulte, l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ (fig.5A) est modifiée. L'épithélium intestinal synthétise peu cette chaîne de collagène et seulement des niveaux très faibles sont retrouvés au niveau du mésenchyme et de la lame basale. Contrairement à la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$, l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ (fig.5B), au domaine basolatéral des cellules épithéliales est maintenue au niveau de l'intestin grêle adulte. Le marquage de cette chaîne de collagène est également maintenu dans la lame basale et un faible marquage persiste au niveau de la lamina propria.

2- Étude de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15

Dans le but d'approfondir l'analyse de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, des études *in vitro* ont été entreprises. Le niveau d'expression des ARNm et protéines des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ a été étudié au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15, la seule lignée intestinale humaine ayant la capacité de se différencier en culture, mimant ainsi la différenciation des entérocytes le long de l'axe crypte-villosité de l'intestin. L'expression des ARNm de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ a également été étudiée sur des échantillons d'intestins grêles foetaux et adultes.

2.1 Transcrits des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$

Au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15, les niveaux d'expression de l'ARNm de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ ont été étudiés par transfert Northern (fig.6). Un transcrit d'environ 5 kb est présent à tous les stades de confluence étudiés (fig.6B (3-8)). L'hybridation des ARNs extraits avec une sonde spécifique pour le GAPDH (ARN d'expression relativement stable) a été utilisée pour effectuer les rapports $\alpha 5(\text{IV})/\text{GAPDH}$, afin d'établir la courbe d'expression de l'ARNm de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ (fig.6A). À sous-confluence, très peu d'ARNm de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est présent (fig.6B (3)) et l'expression du transcrit atteint un niveau maximal peu après la confluence (fig.6A), pour ensuite diminuer avec la différenciation des cellules (fig.6A et B).

L'ARNm de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est exprimé au niveau de l'intestin grêle foetal humain (fig.6B (1)) alors qu'il n'est pas détecté, par analyse Northern, au niveau de l'intestin grêle adulte (fig.6B (2)). Ce résultat confirme le marquage de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ observé, par immunofluorescence, au niveau de l'intestin grêle foetal (fig.4A et C) qui est plus faiblement exprimé au niveau de l'intestin adulte (fig.5A). Le transcrit observé dans l'intestin grêle humain a la même taille que celui observé dans les cellules Caco-2/15. L'hybridation de la membrane avec la sonde GAPDH indique que la quantité d'ARN total des deux échantillons était comparable.

Il n'a pas été possible d'étudier, par analyse Northern, l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15. La sonde

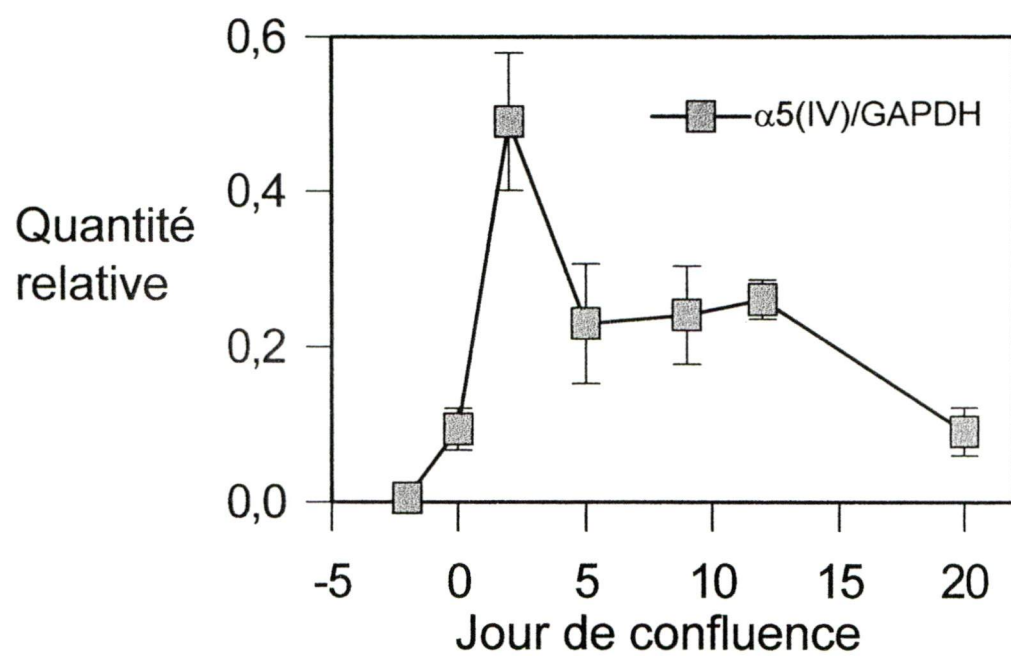
Figure 6. Analyse Northern de l'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 5$ (IV) dans l'intestin foetal et adulte ainsi qu'au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15

Le transcrit de la chaîne $\alpha 5$ (IV) a été détecté par transfert Northern (B) sur des échantillons d'ARN total de jéjunums foetaux de 19 semaines (1) et adultes (2) ainsi qu'à différents stades de confluence des cellules Caco-2/15 (2 jours pré-confluence (3), confluence (4), 3 (5), 8 (6), 13 (7) et 17 jours post-confluence (8)).

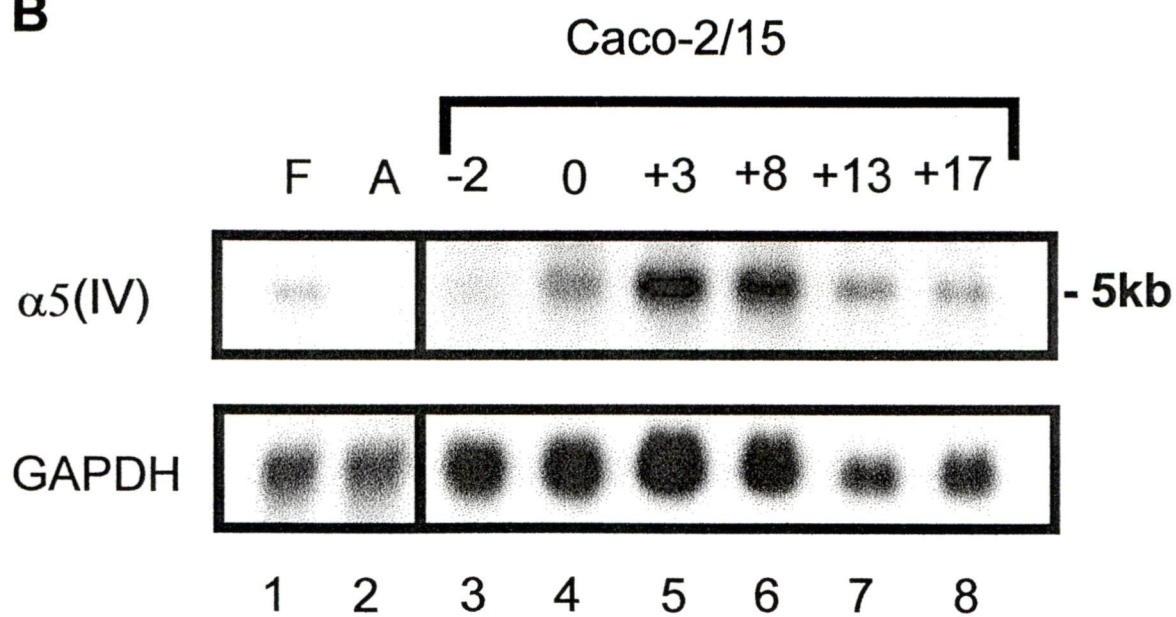
L'ensemble des courbes, obtenues par analyse Northern, de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ (IV) au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 est illustré sur un graphique (A).

L'évaluation de la quantité d'ARN a été effectuée par l'hybridation de cette même membrane avec une sonde spécifique au GAPDH.

A



B



utilisée ne permet pas la détection de signaux assez forts pour rendre possible la quantification des différents niveaux d'expression. Le transcrit, de 7 kb (ZHOU et al., 1993), de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ a tout de même été identifié sur l'échantillon d'ARN poly(A) des cellules Caco-2/15 à 8 jours post-confluence (fig.7 (1)) alors que le transcrit est à la limite de détection sur un échantillon d'ARN total des cellules Caco-2/15, à 8 jours post-confluence (fig.7 (2)).

L'étude de l'expression des ARNm des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 a donc été reprise par analyse RT-PCR (fig.8). Les sondes spécifiques aux chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ont permis l'amplification de fragments de 419 et 1455 pb, respectivement, à tous les stades de confluence des cellules Caco-2/15 (fig.8B). L'amplification des mêmes échantillons, avec les amorces S14 (ARNm d'expression stable), a permis d'effectuer les rapports $\alpha 5(\text{IV})/\text{S14}$ et $\alpha 6(\text{IV})/\text{S14}$ afin d'établir les courbes d'expression des ARNm des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$. Par RT-PCR, l'expression des transcrits des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ est stable, au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 (fig.8A et B).

2.2 Protéines des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$

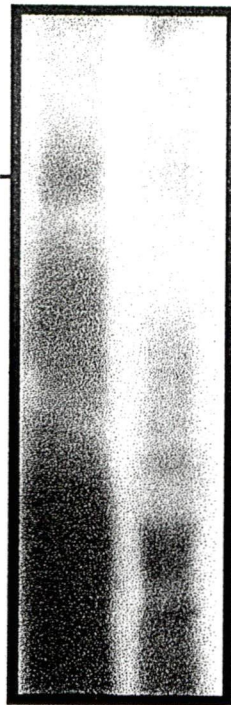
Ensuite, les niveaux d'expression des protéines $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15, ont été analysés par transfert Western (fig.9). Des protéines de 185 et 180 KD, respectivement, sont présentes à tous les stades de confluence étudiés (fig.9B). L'utilisation de l'anticorps spécifique à

Figure 7. Analyse Northern de l'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 6$ (IV) par les cellules Caco-2/15

L'analyse Northern a été effectuée sur des échantillons d'ARNs poly(A) (1) et total (2) isolés des cellules Caco-2/15 à 8 jours post-confluence.

1 2

7kb



28 S

18S

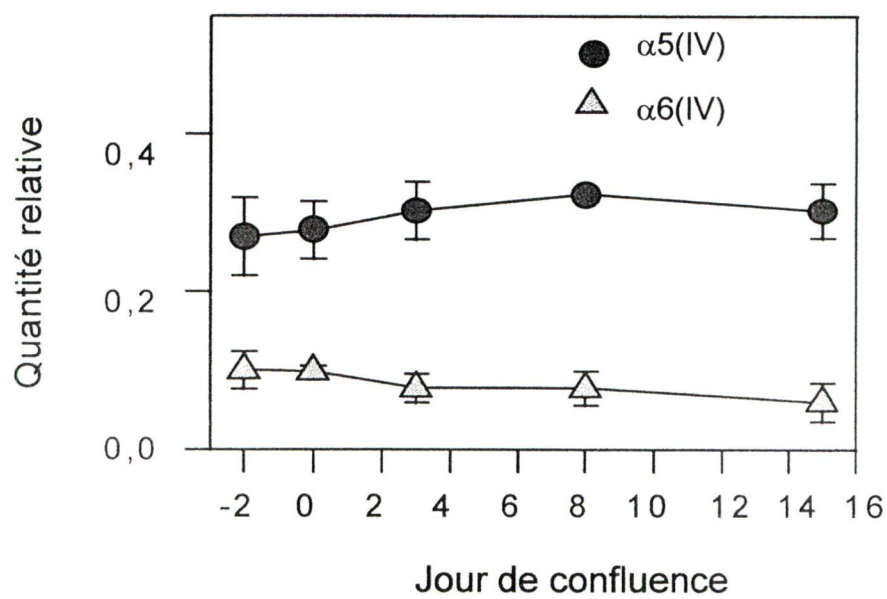
Figure 8. Analyse RT-PCR de l'expression des transcrits des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15

Les transcrits des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ont été détectés par RT-PCR (B) sur des échantillons d'ARN total à différents stades de confluence des cellules Caco-2/15 (2 jours pré-confluence (1), confluence (2), 3 (3), 8 (4) et 15 jours post-confluence (5)).

L'ensemble des courbes, obtenues par analyse RT-PCR, de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 est illustré sur un graphique (A).

L'évaluation de la quantité relative d'ADNc de départ a été effectuée par l'amplification de ces mêmes échantillons avec les amorces de la protéine ribosomale S14.

A



B

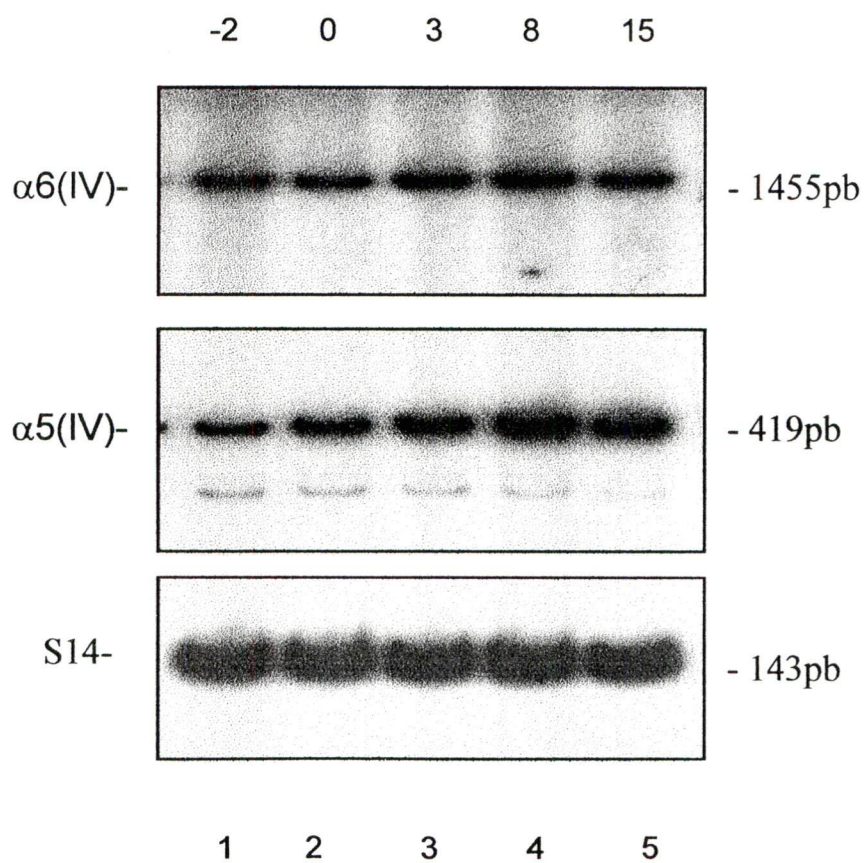


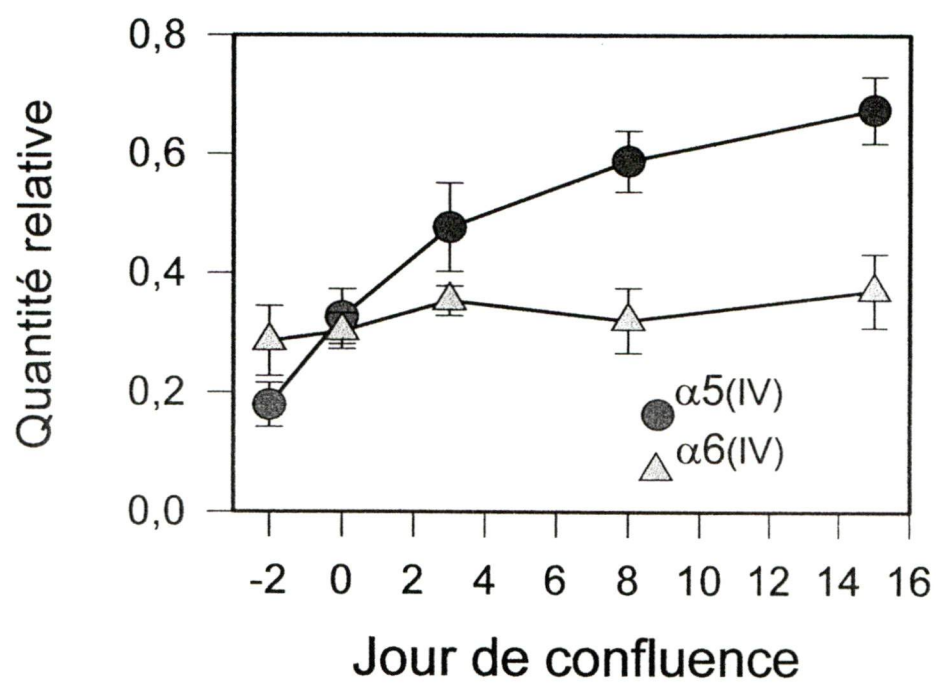
Figure 9. Analyse de l'expression des protéines des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15

Les protéines des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) ont été analysées, par transfert Western (B), sur des lysats protéiques isolés à différents stades de confluence des cellules Caco-2/15 (2 jours pré-confluence (1), confluence (2), 3 (3), 8 (4) et 15 jours post-confluence (5)).

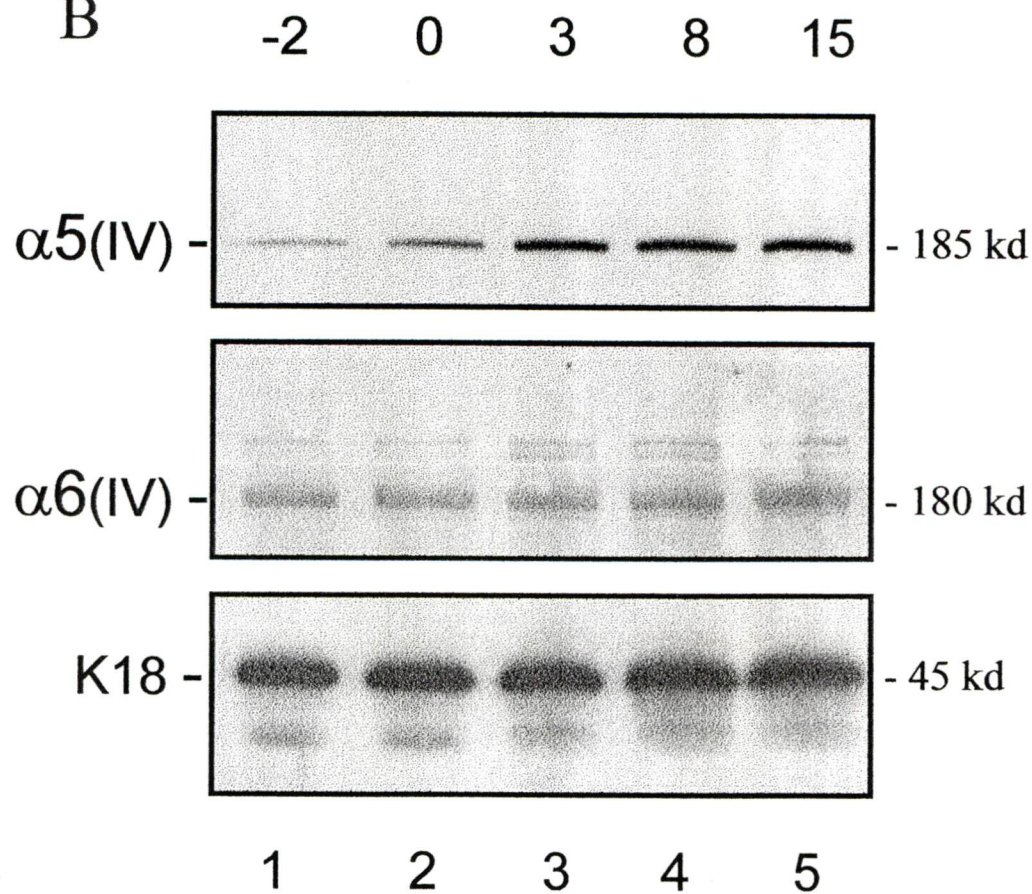
L'ensemble des courbes, obtenues par analyse Western, de l'expression des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 est illustré sur un graphique (A).

L'évaluation de la quantité de protéines a été effectuée par l'utilisation de l'anticorps spécifique à la cytokératine 18, sur la même membrane.

A



B



la cytokératine 18 (protéine d'expression stable) a permis d'effectuer les rapports $\alpha 5(\text{IV})/\text{K18}$ et $\alpha 6(\text{IV})/\text{K18}$ afin d'établir les courbes d'expression des protéines pour les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ (fig.9A). La protéine de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ s'accumule au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 alors que la protéine $\alpha 6(\text{IV})$ demeure stable, peu importe le niveau de confluence de ces cellules.

3- Origine cellulaire et déposition des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV

Comme les cellules Caco-2/15 ont été isolées d'un cancer de côlon et que nos études portent sur l'intestin grêle normal, nous avons vérifié l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ avec deux lignées cellulaires intestinales normales (fig.10). Il s'agit des lignées HIEC et HIM, soit des lignées cellulaires épithéliales et mésenchymateuses, respectivement, isolées d'intestins grêles foetaux. Par RT-PCR, les échantillons d'ARNs totaux des cellules Caco-2/15 à 4 jours post-confluence (fig.10A (1)), HIEC (fig.10A (2)) et HIM à 4 jours post-confluence (fig.10A (3)) permettent l'amplification de fragments de 419 et 1455 pb, correspondant aux chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, respectivement. Par transfert Western, les protéines des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ (185 KD) et $\alpha 6(\text{IV})$ (180 KD) sont également exprimées par les trois lignées cellulaires (fig.10B). Comme ces résultats sont préliminaires, les aspects quantitatifs de ceux-ci ne seront pas discutés. Donc, *in vitro*, les ARNm et protéines des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont synthétisés par les deux compartiments cellulaires de l'intestin grêle, soit l'épithélium et le mésenchyme.

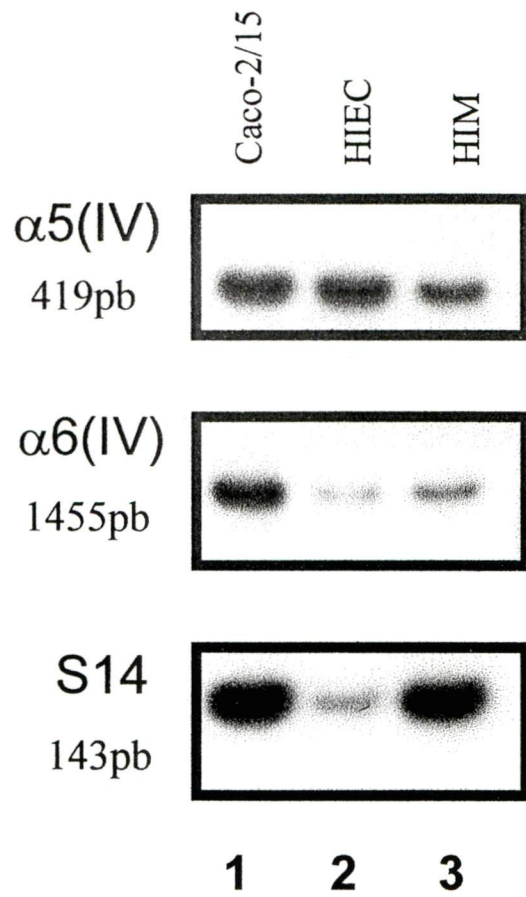
Figure 10. Analyse de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV par les cellules Caco-2/15, HIEC et HIM

Détection des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV), par RT-PCR (A) et transfert Western (B), sur des échantillons de cellules Caco-2/15 à 4 jours post-confluence (1), HIEC (2), et HIM à 4 jours post-confluence (3).

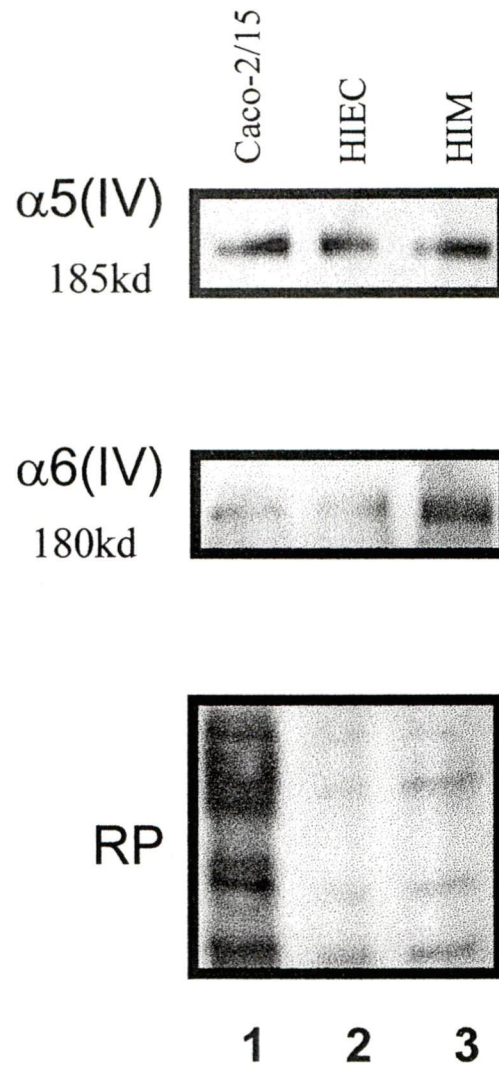
L'évaluation de la quantité relative d'ADNc de départ (A) a été effectuée par l'amplification de ces mêmes échantillons avec les amorces de la protéine ribosomale S14.

La quantité relative des protéines de chacun des échantillons (B) a été visualisée par la coloration de la membrane au rouge ponceau (RP).

A



B



La dissociation, par Matrisperse, de l'épithélium du mésenchyme de fœtus d'intestins grêles, permet l'étude *in vivo* des cellules provenant des deux compartiments cellulaires intestinaux. Par RT-PCR, les cellules épithéliales (fig.11A (1)) et mésenchymateuses (fig.11A (2)), ainsi isolées, expriment toujours les ARNm pour les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$. Par transfert Western (fig.11B), on observe que les deux types cellulaires contiennent également les protéines des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$. Les aspects quantitatifs de ces résultats ne seront pas discutés, puisque les résultats obtenus n'étaient pas tous comparables.

Afin d'étudier les interactions épithélio-mésenchymateuses dans l'intestin grêle foetal, un système de co-culture était déjà établi dans notre laboratoire (VACHON et al., 1993). Ce système, où l'on cultive les cellules Caco-2/15 sur un tapis de cellules HIM, permet d'étudier la déposition des éléments de la matrice extracellulaire. Par immunofluorescence, nous avons donc étudié la déposition du collagène IV à l'interface de ces deux lignées cellulaires (fig.12). Par immunofluorescence sur une co-culture de six jours, on observe l'expression du collagène IV classique ($\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$) par les cellules HIM ainsi que sa déposition à l'interface épithélio-mésenchymateuse (fig.12A). Sur la même co-culture, on note la présence des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ (fig.12B) et $\alpha 6(\text{IV})$ (fig.12C) au niveau du domaine basolatéral des cellules Caco-2/15, des cellules HIM et à l'interface de ces deux lignées cellulaires. Donc, en plus d'être synthétisées par les compartiments épithéliaux et mésenchymateux, les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont déposées à l'interface épithélio-mésenchymateuse, précisément sur la lame basale. Il est important de souligner que les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ne sont pas déposées au

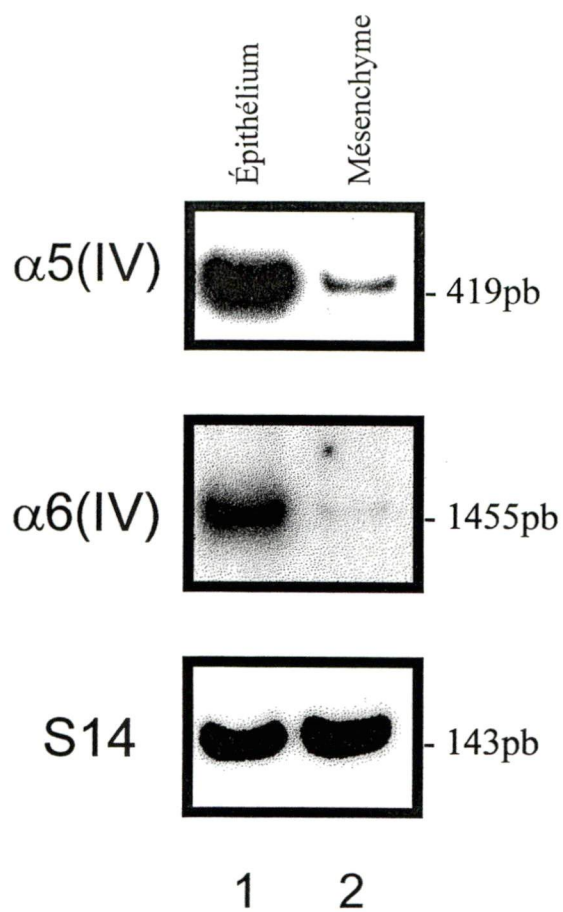
Figure 11. Analyse de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV par les cellules épithéliales et mésenchymateuses isolées par matrisperse

Détection des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, par RT-PCR (A) et transfert Western (B), avec des échantillons de cellules mésenchymateuses (1) et épithéliales (2) obtenus par dissociation au Matrisperse.

L'évaluation de la quantité relative d'ADNc de départ (A) a été effectuée par l'amplification de ces mêmes échantillons avec les amorces de la protéine ribosomale S14.

La quantité relative des protéines de chacun des échantillons (B) a été visualisée par la coloration de la membrane au rouge ponceau (RP).

A



B

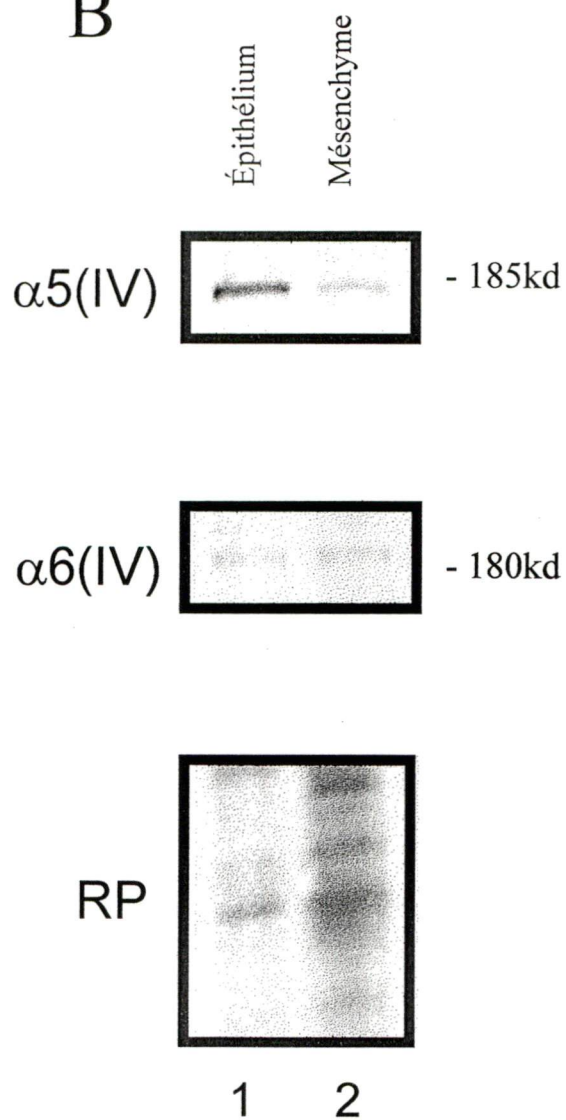
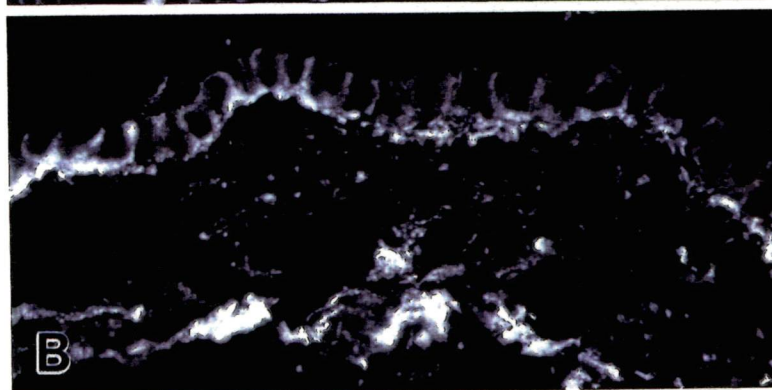
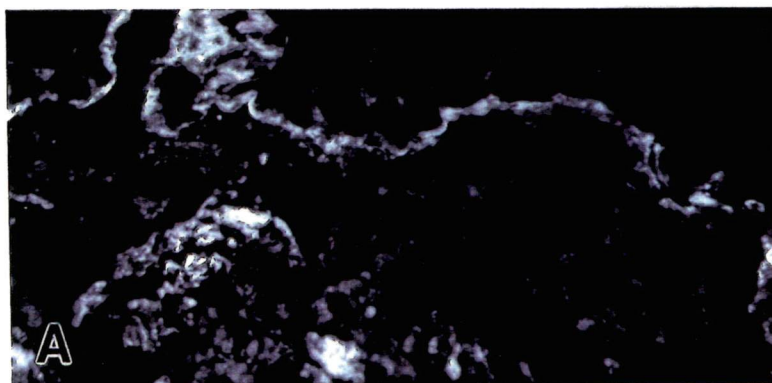


Figure 12. Immunodétection des chaînes $\alpha 1/\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV sur des co-cultures de cellules Caco-2/15 et HIM

Les chaînes $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ (A), $\alpha 5(\text{IV})$ (B) et $\alpha 6(\text{IV})$ (C) ont été détectées par immunofluorescence indirecte sur des sections de co-cultures de 6 jours des cellules Caco-2/15 et HIM.

Grossissement:

A, B et C: 592X



niveau de la lame basale lorsque ces lignées cellulaires sont cultivées en monoculture (non montré).

4- Inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5$ (IV) via le système inductible

LacSwitch

Afin d'étudier le rôle fonctionnel de la chaîne $\alpha 5$ du collagène IV, les cellules Caco-2/15 ont été transfectées par les vecteurs du système inductible LacSwitch. En permettant l'expression d'ARNm anti-sens de la chaîne $\alpha 5$ (IV), nous avons pour objectif d'inhiber l'expression de la chaîne $\alpha 5$ (IV) endogène pour ensuite en étudier les effets.

4.1 Analyse des clones transfectés par le vecteur p3'SS

Des transfections stables du vecteur p3'SS ont été effectuées dans le but de permettre l'expression constitutive du répresseur lac I. Les clones obtenus suite à cette transfection, ont été analysés pour l'expression du répresseur lac I. Afin de s'assurer que les cellules ainsi transfectées se comportaient normalement, l'expression de la sucrase-isomaltase (un marqueur de la différenciation intestinale) a également été vérifiée. Par analyse Northern (fig.13), les transcrits de la sucrase-isomaltase (~ 6 kb) et du répresseur lac I (1,8 kb) sont exprimés à différents niveaux par les treize clones analysés. De façon générale, lorsque l'expression de la sucrase-isomaltase est élevée, celle du répresseur lac I est faible et vice versa. Les clones 7 et 8 ont été sélectionnés pour le bon compromis entre l'expression de la

Figure 13. Analyse de l'expression des transcrits de la sucrase-isomaltase et du répresseur lac I par les clones transfectés avec le vecteur p3'SS du système LacSwitch

Détection de la sucrase-isomaltase et du répresseur lac I, par transfert Northern, sur les échantillons d'ARN total des clones transfectés par le vecteur p3'SS du système LacSwitch (T et 1-13).

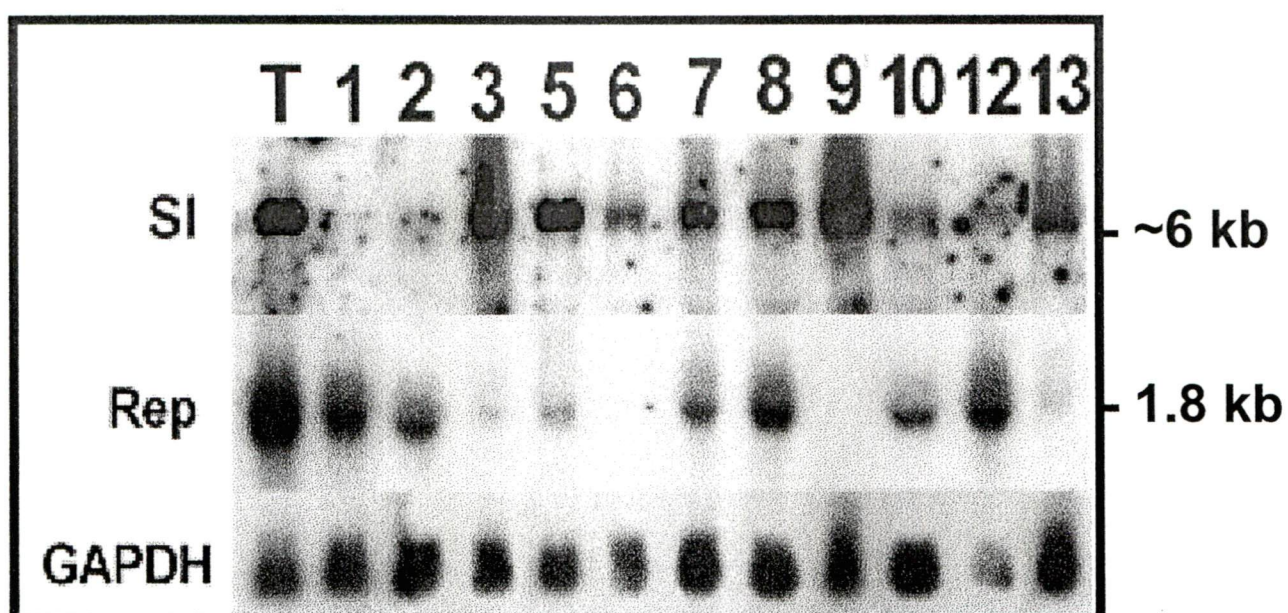
L'évaluation de la quantité d'ARN total a été effectuée par l'hybridation de cette même membrane avec une sonde spécifique au GAPDH.

Abréviations:

T: Mélange des clones d'une transfection

SI: Sucrase-isomaltase

Rep: Répresseur lac I



sucrase-isomaltase et du répresseur lac I. Le clone T représente un mélange de clones transfectés par le vecteur p3'SS. Ce clone illustre bien, par l'expression de la sucrase-isomaltase et du répresseur lac I, l'efficacité générale des transfections.

Afin de s'assurer de la synthèse protéique de la sucrase-isomaltase et du répresseur lactose, une analyse Western a été effectuée (fig.14). Cette analyse confirme la présence des protéines de la sucrase-isomaltase (220 KD) et du répresseur lactose (41 KD) dans les clones 7 et 8. L'expression de la protéine de la chaîne $\alpha 5(IV)$ a également été vérifiée. Le clone 8 a été sélectionné pour subir une seconde transfection avec le vecteur pOPRSVICOL4A5, contenant l'anti-sens.

4.2 Analyse des clones transfectés par le vecteur pOPRSVICOL4A5

Le clone 8 a été transfecté par le vecteur pOPRSVICOL4A5. Les clones ainsi obtenus ont été induits à l'IPTG afin de forcer l'expression de l'anti-sens pour permettre l'inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5(IV)$. L'analyse Northern de l'expression de la chaîne $\alpha 5(IV)$ illustre seulement quatre des seize clones analysés, puisque les résultats obtenus étaient similaires (fig.15). Lorsque ces clones étaient induits à l'IPTG (I), dans aucun cas nous n'avons observé une diminution de l'expression du messenger de la chaîne $\alpha 5(IV)$ (5 kb) par rapport aux contrôles non induits à l'IPTG (C). L'hybridation des membranes avec la sonde GAPDH indique que les quantités d'ARNs étaient comparables pour chacun des clones. Parfois, des produits de dégradation étaient aussi présents (clone 2), mais ceux-ci avaient un niveau d'expression comparable en présence et en absence d'IPTG.

Figure 14. Analyse de l'expression des protéines de la sucrase-isomaltase, du répresseur lac I et de la chaîne $\alpha 5(IV)$ par les clones transfectés avec le vecteur p3'SS du système LacSwitch

Détection de la sucrase-isomaltase, du répresseur lac I et de la chaîne $\alpha 5(IV)$ par transfert Western sur les lysats protéiques des clones transfectés par le vecteur p3'SS.

L'évaluation de la quantité de protéines a été effectuée par l'utilisation de l'anticorps spécifique à la cytokératine 18, sur la même membrane.

Abréviations:

SI: Sucrase-isomaltase

Rep: Répresseur lac I

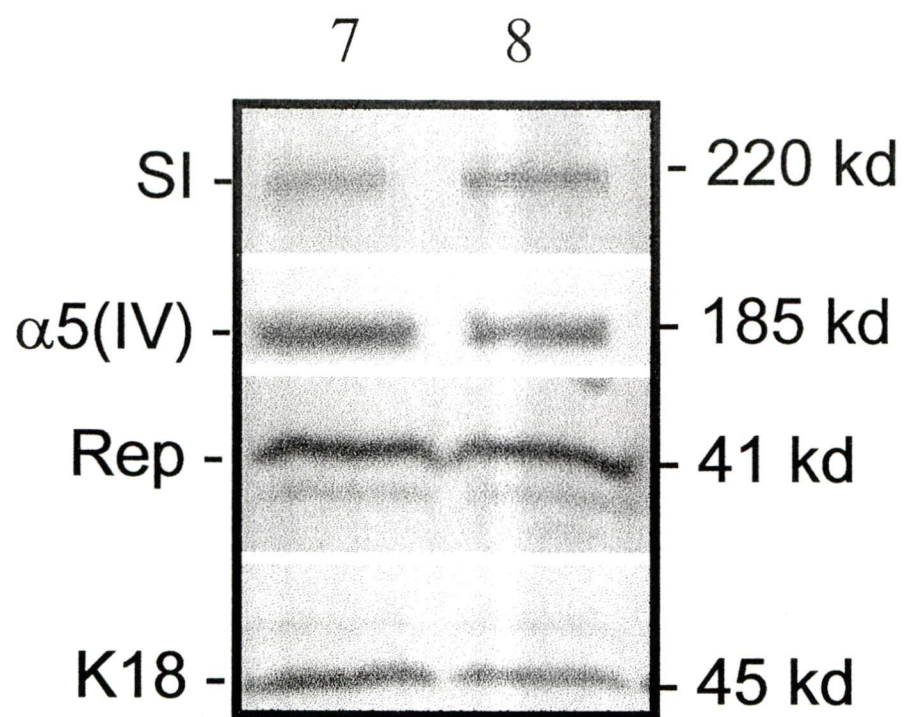


Figure 15. Analyse de l'expression des transcrits de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$, suite à l'induction par l'IPTG, des clones transfectés par les vecteurs du système LacSwitch

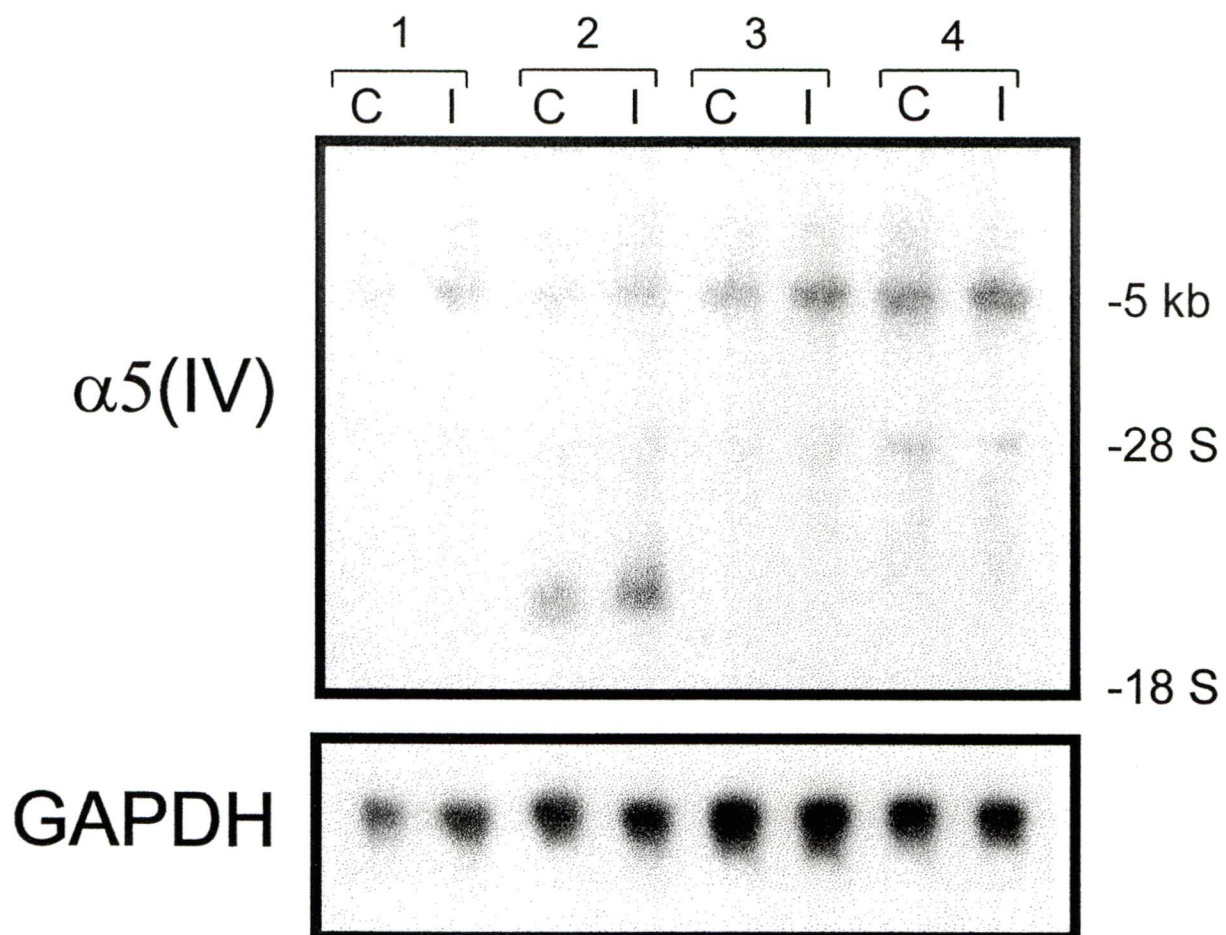
Détection du transcrit $\alpha 5(\text{IV})$ par transfert Northern sur les échantillons d'ARN total des clones transfectés par les deux vecteurs du système LacSwitch (1, 2, 3 et 4), puis induits à l'IPTG.

L'évaluation de la quantité d'ARN total a été effectuée par l'hybridation de cette même membrane avec une sonde spécifique au GAPDH.

Abréviations:

C: Non induit à l'IPTG

I: Induit à l'IPTG



Les résultats décevants de ce système nous ont poussé à nous orienter vers un autre système plus attrayant; soit le système Tet-on qui a déjà fait ses preuves pour plusieurs groupes de recherche (RESNITZKY et al., 1994; HOWE et al. 1995; WU et al., 1995).

5- Inhibition de l'expression des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV) via le système inductible Tet-on

Le système Tet-on est également un système inductible, à la tétracycline, et permet aussi l'expression d'ARNm anti-sens pour inhiber l'expression des protéines endogènes correspondantes.

Toujours dans le but d'étudier le rôle fonctionnel des chaînes $\alpha 5$ (IV) et $\alpha 6$ (IV), les cellules Caco-2/15 ont d'abord été transfectées par le vecteur p172-1 neo pour l'expression constitutive du transactivateur. Suite à la sélection, les clones ainsi obtenus ont été transfectés avec le vecteur pUHC 13-3 (luciférase comme gène d'intérêt), de façon transitoire. Cette transfection transitoire est effectuée avec l'objectif de déterminer le niveau d'inductibilité à la doxycycline (analogue plus puissant de la tétracycline) des clones exprimant le transactivateur, via des essais luciférases. De cette façon, on s'assure d'une efficacité optimale pour l'expression subséquente des ARNm anti-sens.

L'établissement d'une lignée cellulaire hautement inductible à la doxycycline est donc une étape très importante. Les niveaux d'induction que nous avons

obtenus pour les clones transfectés par les vecteurs p172-1 neo et pUHC 13-3 sont indiqués au tableau 6. Le meilleur niveau d'induction à la doxycycline est de 55X et a été obtenu avec le clone 2-1. Cependant les niveaux d'induction obtenus risquent d'être insuffisants pour inhiber l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène IV, puisque celles-ci sont fortement exprimées par les cellules Caco-2/15. Les clones 1H et 2H représentent, en fait, deux populations hétérogènes sélectionnées à 200 et 800 $\mu\text{g/ml}$ de G418, respectivement. Les niveaux d'induction pour ces deux populations (1X pour le clone 1H et 10X pour le clone 2H) suggèrent qu'en augmentant la concentration de l'agent de sélection on peut favoriser l'obtention de clones plus inductibles à la doxycycline. C'est pourquoi, lors de la deuxième série de transfections du vecteur p172-1 neo (clones 2-1 à 2-14), une sélection plus sévère a été appliquée.

Tableau 6. Inductibilité à la doxycycline des clones transfectés par les vecteurs p172-1 neo et pUHC 13-3

Clone	[G418]	Inductibilité
1H	200 μ g/ml	1X
2H	800 μ g/ml	10X
3	800 μ g/ml	9X
4	800 μ g/ml	1X
5	800 μ g/ml	1X
6	800 μ g/ml	5X
2-1	1200 μ g/ml	55X
2-2	1200 μ g/ml	—
2-3	1200 μ g/ml	1X
2-4	1200 μ g/ml	7X
2-5	1200 μ g/ml	16X
2-6	1200 μ g/ml	1X
2-7	1200 μ g/ml	7X
2-8	1200 μ g/ml	1X
2-9	1200 μ g/ml	26X
2-10	1200 μ g/ml	9X
2-11	1200 μ g/ml	2X
2-12	1200 μ g/ml	4X
2-13	1200 μ g/ml	1X
2-14	1200 μ g/ml	7X

IV. DISCUSSION

1- Localisation du collagène de type IV dans l'intestin grêle humain

Le collagène de type IV constitue une famille de glycoprotéines majeures des lames basales. Il est maintenant bien établi que les chaînes $\alpha 1$ et $\alpha 2$ du collagène IV sont des molécules d'expression ubiquitaire, alors que les autres chaînes identifiées ($\alpha 3$ - $\alpha 6$) ont une distribution plus restreinte. L'expression ubiquitaire ainsi que l'absence de régulation de la synthèse des chaînes $\alpha 1$ (IV) et $\alpha 2$ (IV) au cours du développement intestinal et le long de l'axe crypte-villosité limite beaucoup l'intérêt de ces molécules en tant que médiateur des interactions épithélio-mésenchymateuses impliquées dans le développement (BEAULIEU, 1997). L'expression "tissus-spécifique" des autres chaînes de collagène est un bon indice de leur implication potentielle au niveau des lames basales où elles sont déposées.

Avant d'entreprendre mes études sur l'expression du collagène IV, au niveau de l'intestin, notre groupe de recherche avait déjà démontré que les chaînes $\alpha 3$ (IV) et $\alpha 4$ (IV) n'étaient pas exprimées par l'intestin, alors que la chaîne $\alpha 5$ (IV) y était synthétisée (BEAULIEU et al., 1994). À ce moment, la présence de la chaîne $\alpha 6$ (IV) n'avait pas encore été étudiée, au niveau de l'intestin, vue sa découverte récente (ZHOU et al., 1993). La présence de la chaîne $\alpha 6$ (IV) dans cet organe a tout d'abord été démontrée par immunofluorescence indirecte.

La formation de l'intestin l'humain ainsi que sa maturation fonctionnelle s'effectuent en plusieurs étapes durant l'embryogénèse; au cours de cette période, le patron de distribution des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ demeure sensiblement le même. Ces deux chaînes sont co-exprimées au niveau du domaine basolatéral des cellules épithéliales et déposées au sein de la lame basale intestinale. Par contre, les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ne sont pas co-exprimées au niveau du mésenchyme de l'intestin foetal: seulement la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ y est détectée.

La distribution inhabituelle de ces deux molécules au domaine basal et latéral des cellules épithéliales peut suggérer une implication potentielle des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au niveau des interactions cellule-cellule et cellule-matrice pendant le développement foetal. Cette hypothèse est supportée par l'évidence que les intégrines $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$, trois récepteurs du collagène IV (RUOSLAHTI, 1991; HYNES, 1992; ALBELDA, 1993), sont aussi localisés au domaine basolatéral de différents types cellulaires (KAUFMANN et al., 1989; LARJAVA et al., 1990; LAMPUGNANI et al., 1991). C'est la première fois qu'on observe, au niveau de l'intestin, un marquage où les chaînes de collagène IV traduites à partir des transcrits des gènes siégeant sur le même chromosome ne sont pas co-exprimées. Cependant, l'absence de co-expression de ces deux chaînes de collagène a déjà été observée au niveau de la membrane basale glomérulaire où seulement la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est présente (NINOMIYA et al., 1995; PEISSEL et al., 1995). Récemment, il a été montré que le gène COL4A6 comporte deux exons 1, alternativement transcrits à partir de deux promoteurs (SUGIMOTO et al., 1994). Cette organisation pourrait être déterminante pour le rapport d'expression des deux gènes

dans différents organes. Puisque les molécules de collagène IV sont formées par l'enroulement de trois chaînes α et que les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ne sont pas toujours co-localisées, il faut concevoir la présence de combinaisons autres que $[\alpha 5(\text{IV})_2\alpha 6(\text{IV})]$. La possibilité de l'existence d'homotrimères $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ et d'hétérotrimères différents de $[\alpha 5(\text{IV})_2\alpha 6(\text{IV})]$ doit être analysée.

Une autre observation intéressante est que les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ne se comportent pas de la même façon au cours du développement de l'intestin grêle. En fait, la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ n'est que faiblement détectée au niveau de l'intestin adulte, alors que l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ est maintenue dans l'intestin grêle adulte. Ceci suggère que l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ serait régulée négativement au cours du développement (aussi confirmé par analyse Northern). Cette régulation négative de l'expression de cette chaîne contraste avec celle de la plupart des autres composés de la matrice extracellulaire détectés dans la muqueuse intestinale, lesquels demeurent exprimés à des niveaux comparables de la mi-gestation à l'âge adulte, tels les chaînes du collagène IV classique, les chaînes de la laminine, les protéoglycans héparan sulfate et les variants de ténascine (BEAULIEU et al., 1991; BEAULIEU, 1992; BEAULIEU et al., 1993; BEAULIEU et VACHON, 1994). La chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ pourrait donc jouer un rôle spécifique, mais toujours hypothétique, pendant le développement intestinal, alors que le maintien de l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ serait toujours requis au niveau de l'intestin adulte. Des études sur la régulation transcriptionnelle et la synthèse des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont requises pour expliquer l'arrêt de la synthèse de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ et le maintien de la synthèse de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ à l'âge adulte.

2- Étude de l'expression des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales

L'épithélium intestinal de l'axe crypte-villosité étant un excellent modèle pour l'étude de la différenciation cellulaire, l'expression des chaînes $\alpha 5(IV)$ et $\alpha 6(IV)$ a été analysée au cours de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Cette étude impossible *in vivo* a été effectuée avec la lignée cellulaire Caco-2/15, la seule lignée intestinale humaine avec la capacité de se différencier spontanément en culture.

L'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 5(IV)$ a été étudiée par analyse Northern et RT-PCR. Par analyse Northern, l'expression de la chaîne $\alpha 5(IV)$ atteint un niveau d'expression maximal peu après la confluence puis diminue aux stades de confluence plus avancés chez les cellules Caco-2/15. Une telle courbe d'expression a déjà été observée pour la lactase, un marqueur de la différenciation intestinale, toujours au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 (VAN BEERS et al., 1995). Cependant, les études, par RT-PCR, de l'expression de la chaîne $\alpha 5(IV)$ indiquent plutôt des niveaux stables d'expression du transcrit $\alpha 5(IV)$ pendant tout le processus de la différenciation des cellules Caco-2/15. Comme la courbe d'expression obtenue par Northern est facilement reproductible et que les analyses Northern sont très sensibles, la courbe d'expression observée par Northern semble l'hypothèse la plus plausible. En effet, il est possible que de faibles variations d'expression ne soient pas visibles suite aux nombreux cycles d'amplification par PCR. Il serait sûrement plus approprié d'utiliser une méthode

plus quantitative, comme le RT-PCR compétitif ou le "RNase-Protection Assay" par exemple, pour reproduire les résultats de l'analyse Northern.

Malheureusement, l'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ a seulement pu être étudiée par RT-PCR, comme son niveau de détection, par analyse Northern, était trop faible pour être quantifié. Étant donné que les résultats de RT-PCR obtenus pour la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ ne correspondent pas aux analyses Northern,, aucune conclusion ne peut vraiment être émise par rapport aux niveaux de l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15. D'autres approches plus quantitatives s'avèrent également nécessaires.

Les courbes d'expression protéique pour les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ne se comportent pas de la même manière au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15. De façon similaire à la lactase (VAN BEERS et al., 1995), la protéine $\alpha 5(\text{IV})$ s'accumule avec la différenciation des cellules. D'un autre côté, l'expression de la protéine $\alpha 6(\text{IV})$ demeure stable au cours de la différenciation de ces cellules. Il est probable que cette dernière protéine soit moins stable que celle de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$, la rendant ainsi plus vulnérable à la dégradation, empêchant alors son accumulation.

3- Origine cellulaire des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV déposé au niveau de la lame basale intestinale

La lame basale intestinale est un mince feuillet spécialisé où se concentrent

les éléments de la matrice extracellulaire, dont le collagène de type IV. Toutes les chaînes de collagène IV, exprimées au niveau de l'intestin grêle humain ($\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$), sont déposées à l'interface épithélio-mésenchymateuse.

Une observation intéressante sur la présence des chaînes $\alpha 1(IV)/\alpha 2(IV)$ au niveau de la lame basale intestinale est son origine exclusive du compartiment mésenchymateux (SIMON-ASSMANN et al., 1990; HEWITT et al., 1992). *In vitro*, les cellules mésenchymateuses intestinales ou fibroblastiques en mono-culture, mais non les cellules épithéliales, expriment de fortes quantités de ces chaînes, alors que le marquage par immunofluorescence indirecte indique un patron de distribution diffus et exempt de structure ressemblant aux lames basales (SIMON-ASSMANN et al., 1988; VACHON et al., 1993). Cependant, avec un système de co-culture (cellules Caco-2/15 cultivées sur les cellules HIM), une forte déposition des chaînes $\alpha 1(IV)/\alpha 2(IV)$ a été observée à l'interface épithélio-mésenchymateuse, suggérant que l'épithélium est requis pour la formation des lames basales.

D'un autre côté, la chaîne $\alpha 5(IV)$ est synthétisée, *in vivo* et *in vitro*, par les cellules épithéliales et mésenchymateuses (BEAULIEU et al., 1994). Même si, par immunofluorescence indirecte, la chaîne $\alpha 6(IV)$ semble synthétisée seulement par les cellules épithéliales, la culture de cellules (Caco-2/15, HIEC et HIM) et les cellules isolées par Matrisperse confirment également la double origine de la chaîne $\alpha 6(IV)$. Cependant, la question à savoir si la proportion de ces deux chaînes incorporée au niveau de la lame basale provient des deux types cellulaires ou non, n'est toujours pas résolue. Toutefois, leur accumulation à l'interface épithélio-

mésenchymateuse en co-culture, de façon similaire au tissu intact, semble dépendre de la présence des deux compartiments cellulaires.

4- Détermination des rôles fonctionnels des chaînes $\alpha 5$ et $\alpha 6$ du collagène de type IV

L'expression restreinte des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, la localisation inhabituelle de ces molécules au domaine basolatéral des cellules épithéliales, l'absence de co-expression de ces chaînes au niveau du mésenchyme, la régulation négative de l'expression de la chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et le maintien de l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ au cours du développement intestinal sont tous des éléments qui suggèrent que les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ ont des fonctions physiologiques importantes au niveau de l'intestin.

Afin de déterminer les rôles fonctionnels de ces deux molécules, l'inhibition de l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ ou $\alpha 6(\text{IV})$, par la transfection des cellules Caco-2/15 avec les ADNc anti-sens respectifs, est la stratégie qui a été envisagée. La réversibilité de l'expression des anti-sens était un intérêt majeur pour l'utilisation des systèmes inductibles LacSwitch et Tet-on. Aussi, la lignée cellulaire Caco-2/15 est un excellent modèle pour l'étude des rôles fonctionnels des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$. En effet, cette lignée de cellules épithéliales intestinales n'exprime que ces deux chaînes de collagène IV (BEUALIEU et al., 1994) et est la seule lignée intestinale se différenciant spontanément en culture (MÉNARD et BEAULIEU, 1994).

Les deux systèmes inductibles disponibles pour l'étude fonctionnelle des gènes dans les cellules eucaryotes ont fait l'objet de plusieurs études d'efficacité. Sans contredit, le système inductible à la tétracycline semble, jusqu'à présent, le système inductible le plus efficace. Malgré l'assimilation rapide et la stabilité intracellulaire de l'inducteur du système LacSwitch (IPTG) (WYBORSKI et SHORT, 1991), cet inducteur a une action plutôt lente et inefficace ayant pour conséquence des inductions modérées (GOSSEN et BUJARD, 1992). Ce système est une approche qui a connu certains succès, par exemple pour le virus vaccinia (ZHAN et al., 1992) et pour le gène Cdx-2 dans les cellules IEC-6 (SUH et TRABER, 1996). L'induction, par l'IPTG, du gène Cdx-2 dans les cellules IEC-6, permet l'induction de la différenciation intestinale (SUH et TRABER, 1996)

Les avantages du système Tet-on sur le système LacSwitch sont les suivants:

- Haute spécificité du répresseur tétracycline pour sa séquence opératrice (GOSSEN et al., 1995).
- Haute affinité de la tétracycline pour le répresseur tétracycline (GOSSEN et BUJARD, 1992). Le répresseur tétracycline a une meilleure affinité pour la tétracycline ($K_a \sim 10^9 M^{-1}$) (TAKAHASHI et al., 1986) que le répresseur lac I pour l'IPTG ($K_a \sim 10^6 M^{-1}$) (BARKLEY et BOURGEOIS, 1980). La doxycycline, un analogue de la tétracycline, présente une meilleure affinité pour le répresseur tétracycline que la

tétracycline (GOSSEN et al., 1995). De très faibles concentrations, non toxiques, de doxycycline peuvent donc être efficace.

- La puissance du domaine d'activation de la transcription du virus herpes simplex, VP16 (GOSSEN et al., 1995).
- La rapidité de l'induction. Contrairement à l'IPTG, la doxycycline peut agir rapidement en culture de cellules eucaryotes (GOSSEN et al., 1995) .
- Ce système peut stimuler l'expression d'un gène rapporteur plus de 10^5 X dans les cellules Hela (GOSSEN et al., 1995).
- L'utilisation d'un système activateur est préférable à celle d'un système répresseur (GOSSEN et BUJARD, 1992).

Le système Tet-on n'est toutefois pas un système parfait, puisque son utilisation présente certaines difficultés. La plus haute difficulté consiste à établir un clone stable et hautement inductible à la doxycycline. Cette étape est très importante d'autant plus que les chaînes $\alpha 5(IV)$ et $\alpha 6(IV)$ sont fortement synthétisées par les cellules Caco-2/15. Il est également important d'être conscient des faiblesses de ce système. Le niveau maximal et de base de l'expression du gène d'intérêt peut varier pour différents types cellulaires (Yin et al., 1996). Le Dr. Howe et collaborateurs ont démontré que les cellules HEK 293,

contrairement aux cellules GH3, ne fournissent pas l'environnement cellulaire dans lequel l'expression d'un gène hétérologue peut être étroitement contrôlée en réponse à la tétracycline (HOWE et al., 1995). Aucune recherche n'illustre que le système Tet-on peut bien fonctionner avec les cellules Caco-2/15 et certains croient que des cellules d'origine cancéreuse pourraient éliminer les agents de sélection et d'induction à l'extérieur des cellules. Également, il faut prendre en considération que le niveau d'inductibilité à la doxycycline des clones dépend directement du site d'intégration des vecteurs et du nombre de copies de transactivateur intégrées dans le génome cellulaire: des éléments sur lesquels nous n'avons aucun contrôle. Finalement, la spécificité du transactivateur peut être contestée, puisqu'il a clairement été démontré que ce transactivateur ne module pas seulement l'activité du gène d'intérêt. Le transactivateur peut également induire l'expression de certains gènes endogènes (ex.: C/EBP β , récepteur des glucocorticoïdes et SP1) (MAGALINI et al., 1995). Les résidus VP16 présents dans la protéine de fusion pourraient être encore capables de certaines interactions avec des facteurs généraux de transcription menant à la séquence d'activation de différents promoteurs.

Puisque des niveaux significatifs d'induction à la doxycycline sont obtenus avec la lignée cellulaire Caco-2/15, l'utilisation de cette lignée ne semble pas causer de problèmes majeurs. Il s'agit donc de poursuivre en analysant encore plusieurs clones afin de pouvoir évaluer les rôles fonctionnels des chaînes $\alpha 5(IV)$ et $\alpha 6(IV)$ avec celui qui présentera la plus forte inductibilité à la doxycycline.

Dans le cas où l'inhibition de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ s'avèrerait incomplète avec le système inductible Tet-on, comme pour le système LacSwitch, une autre approche devrait être envisagée. La transfection d'oligonucléotides a déjà été considérée et s'est avérée inefficace vue l'énorme quantité d'oligonucléotides qui sont nécessaires pour inhiber l'expression de ces deux chaînes de collagène IV et les frais trop onéreux que cela nécessiterait. Il faudrait plutôt s'orienter vers un système non inductible permettant une très forte expression des anti-sens ou encore imaginer l'expression suffisante de dominant-négatif de collagène avec les domaines NC1 et 7S tronqués pour empêcher l'assemblage du réseau de collagène IV et contrer l'effet des molécules normales.

V. CONCLUSION

L'intérêt porté sur l'expression des chaînes du collagène IV vient très souvent de l'implication pathologique des chaînes $\alpha 3(\text{IV})$ à $\alpha 6(\text{IV})$ (maladie de Goodpasture, SA et LOD). L'étude de l'expression des constituants de la lame basale épithéliale au cours du développement intestinal étant un volet important des recherches menées par notre équipe de recherche, nous nous sommes donc intéressé à analyser l'expression des chaînes du collagène IV, un constituant majeur des lames basales, au niveau de l'intestin humain. La présente étude portait principalement sur l'analyse de l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ puisque les chaînes $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$, identifiées depuis longtemps, ont une expression ubiquitaire et que les chaînes $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})$ ne sont pas exprimées au niveau de l'intestin humain (BEAULIEU et al., 1994).

Les chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ sont toutes les deux synthétisées par l'intestin, mais leur patron d'expression diffère. Au niveau de l'intestin foetal, ces deux molécules sont détectées, par immunofluorescence indirecte, au niveau du domaine basolatéral des cellules épithéliales et de la lame basale. Cependant, seulement la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est clairement exprimée dans le compartiment mésenchymateux. Également, l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ est régulée négativement au cours du développement intestinal, alors que l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ est maintenue au niveau de l'intestin adulte. Il y aurait donc deux réseaux de collagène IV présents au niveau des lames basales intestinales: le premier étant composé des chaînes $\alpha 1(\text{IV})$ et $\alpha 2(\text{IV})$ et le second des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$.

Des études *in vitro*, avec des lignées cellulaires intestinales en mono- et co-culture, ont confirmé l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ par les deux compartiments cellulaires intestinaux: soit l'épithélium et le mésenchyme. La déposition de ces deux molécules de collagène IV au niveau d'une structure correspondant à lame basale semble dépendre de la présence des deux compartiments cellulaires. En effet, lorsque l'on cultive les lignées cellulaires Caco-2/15 (cellules épithéliales) et HIM (cellules mésenchymateuses) en co-culture, on observe une déposition des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ à l'interface de ces deux lignées cellulaires, alors qu'aucune déposition de ce genre n'est obtenue lorsque ces lignées cellulaires sont cultivées en mono-culture.

L'intestin étant un excellent modèle pour l'étude de la différenciation cellulaire, des études *in vitro* ont été effectuées pour analyser l'expression des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$ au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15 (lignée cellulaire ayant la capacité de se différencier spontanément en culture). Par analyse Northern, il y a une modulation du transcrit de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ au cours de la différenciation intestinale: on observe une augmentation de son ARNm jusqu'à un niveau maximal atteint peu après la confluence, suivi d'une diminution de l'expression de son transcrit. Il est encore trop tôt pour conclure sur l'expression du transcrit de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ au cours de la différenciation cellulaire, comme le transcrit de cette chaîne est à peine détectable, par analyse Northern. Par transfert Western, on constate une accumulation de la protéine de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$, alors que le niveau de l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ est stable au cours de la différenciation des cellules Caco-2/15.

La distribution restreinte des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$, leur expression au domaine basolatéral des cellules épithéliales, leur déposition au niveau de la lame basale épithéliale, la régulation négative de l'expression de la chaîne $\alpha 5(\text{IV})$ et le maintien de l'expression de la chaîne $\alpha 6(\text{IV})$ au cours du développement intestinal ont contribué à l'intérêt de la poursuite de nos études. Nous avons donc entrepris de mettre au point un système inductible permettant l'étude des rôles fonctionnels des chaînes $\alpha 5(\text{IV})$ et $\alpha 6(\text{IV})$. Ces études sont présentement en cours.

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements à mon directeur de recherche, le docteur Jean-François Beaulieu, pour son importante contribution à ma formation scientifique.

Je profite aussi de l'occasion pour remercier les membres du laboratoire et du département pour leur soutien, leur judicieux conseils et leur amitié.

Finalement, je remercie sincèrement la Fondation Georges Phenix et l'Université de Sherbrooke (bourse institutionnelle) pour leur soutien financier.

BIBLIOGRAPHIE

Albelda S.M., (1993) Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab. Invest.* 68:4-17

Almann G.G., Leblond C.P., (1982) Changes in the size and structure of the nucleolus of columnar cells during their migration from crypt base to villus top in rat jejunum. *J. Cell Sci.* 56:83-99

Antignac C., Knebelmann B., Drouot L., Gros F., Deschênes G., Hors-Cayla M.C., Zhou J., Tryggvason K., Grünfeld J.P., Broyer M., Gubler M.C., (1994) Deletions in the COL4A5 collagen gene in X-linked Alport syndrome. Characterization of the pathological transcripts in nonrenal cells and correlation with disease expression. *J. Clin. Invest.* 93:1195-11207

Aumailly M., Timpl R., (1984) Attachment of cells to basement membrane collagen type IV. *J. Cell. Biol.*, 103:1569-1575

Barkley M.D., Bourgeois S., (1980) The operon (ed), Miller J.H., Reznikoff W.S., Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, N.Y., p 177-220

Barnard J.A., Beauchamp R.D., Coffey R.J., Moses H.L., (1989) Regulation of epithelial cell growth by transforming growth factor type β . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:1578-1582

Beaulieu J-F., Nichols B., Quaroni A., (1989) Posttranslational regulation of sucrase-isomaltase expression in intestinal crypt and villus cells. J. Biol. Chem. 264:20000-20011

Beaulieu J-F., Weiser M.M., Herrera L., Quaroni A., (1990) Detection and characterization of sucrase-isomaltase in adult human colon and in colonic polyps. Gastroenterology 98:1467-1477

Beaulieu J-F., Quaroni A., (1991) Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human adenocarcinoma cells Caco-2. Biochem. J. 280:599-608

Beaulieu J-F., Vachon P.H., Chartrand S., (1991) Immunolocalization of extracellular matrix components during organogenesis in the human small intestine. Anat. Embryol. 183:363-369

Beaulieu J-F., Millane G., Calvert R., (1992) Developmental expression of two antigens associated with mouse intestinal crypt. Dev. Dyn. 193:325-331

Beaulieu J-F., Jutras S., Durand J., Vachon P.H., Perreault N., (1993) Relationship between tenascin and α -smooth muscle actin expression in the developing human small intestinal mucosa. Anat. Embryol. 188:149-158

Beaulieu J-F., Jutras S., Kusakabe M., Perreault N., (1993) Expression of tenascin in the developing human small intestine. Biochem. Biophys. Res. Comm. 192:1086-1092

Beaulieu J-F., Vachon P.H., (1994) Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. Gastroenterology 106:829-839

Beaulieu J-F., Vachon P.H., Herring-Gillam E., Simoneau A., Perreault N., Asselin C., Durand J., (1994) Expression of the $\alpha 5(\text{IV})$ collagen chain in the fetal human small intestine. Gastroenterology 107:957-967

Beaulieu J.-F., (1997) Expression of extracellular matrix components and integrins in relationship to intestinal epithelial cell differentiation *in vivo*. Prog. Histochem. Cytochem. 31(4):1-76

Bissell M.J., Hill M.G., Party G.H., (1982) How does the extracellular matrix direct gene expression? J. Theor. Biol. 99:31-68

Bjerknes M., Cheng H., (1981) The stem-cell zone of the small intestinal epithelium. III. Evidence from columnar, enteroendocrine, and mucus cells in the adult mouse. Am. J. Anat. 160:77-91

Bosman F.T., Bebrune A., Flohil C., Van Der Wurff A., Tem Date J., Dinjens W.W.M., (1993) Epithelial-stromal interactions in colon cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 37:203-211

Brown J.C., Timpl R., (1995) The collagen superfamily. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 107:484-490

Burbelo P.D., Klotman P., Bruggeman L., Clément B., Yamada Y., (1990) Regulation of basement membrane genes. *Crit. Rev. Euk. Gene Express.* 1:1-10

Burgeson R.E., Mimmi M.E., (1992) Molecular structure and tissue distribution. *Clin. Orthopaedics* 282:250-272

Cole W.G., (1994) Collagen genes: mutations affecting collagen structure and expression. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Bio.* 47:29-44

Cybulsky A.V., Carbonetto S., Cyr M.D., Mctavish A.J., Huang Q., (1993) Extracellular matrix-stimulated phospholipase activation is mediated by beta 1-integrin. *Am. J. Physiol.* 264:C323-C332

Engvall E., (1993) Laminin variants: why, where and when? *Kidney Int.* 43:2-6

Foley K.P., Leonard M.W., Engel J.D., (1993) Quantitation of RNA using the polymerase chain reaction. *Technical Focus* 9:380-385

Garrod D.R., (1993) Cell to cell and cell to matrix adhesion. *Brit. Med. J.* 306:703-705

Giry-Lozinguez C., Kleman J., Van der Rest M., (1994) Interactions moléculaires et modularité des protéines au sein des matrices extracellulaires. *Med. Sci.* 10:1234-1232

Gossen M., Bujard H., (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5547-5551

Gossen M., Bonin A.L., Bujard H., (1993) Control of gene activity in higher eukaryotic cells by prokaryotic regulatory elements. *Trends Biochem. Sci.* 18:471-475

Gossen M., Freundlieb S., Bender G., Müller G., Hillen W., Bujard H., (1995) Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268:1766-1769

Green F., Edwards Y., Hauri H-P., Povey S., Wan Ho M., Pinto M., Swallow D., (1987) Isolation of a cDNA probe for a human jejunal brush-border hydrolase, sucrase-isomaltase, and assignment of the gene locus to chromosome 3. *Gene* 57:101-110

Haffen K., Kedinger M., Simon-Assmann P., (1989) Cell contact dependent regulation of enterocytic differentiation. Human gastrointestinal development. E. Lebenthal (ed.), Raven Press, New York, p.19-39

Hay E.D., (1981) Extracellular matrix. J. Cell. Biol. 91:205s-223s

Heidet L., Forestier L., Antignac C., Gubler M.-C., (1997) Syndrome d'Alport, une maladie héréditaire du collagène de type IV. Med. Sci. 13:28-36

Heikkilä P., Soininen R., (1996) The type IV collagen family. Tryggvason K. (ed), Molecular pathology and genetics of Alport syndrome, Basel:Karger, p105-129

Hermos J.A., Mathan M., Trier J.S., (1971) DNA synthesis and proliferation by villous epithelial cells in fetal rats. J. Cell Sci. 50:255-258

Hewitt R.E., Powe D.G., Carter G.I., Turner D.R., Price J.E., (1992) Basement membrane collagen-IV synthesis in colorectal tumors. Int. J. Cancer 51:530-536

Hinglais N., Grünfeld J.P., Bois E., (1972) Characteristic ultrastructural lesion of the glomerular lesion of the glomerular basement membrane in progressive hereditary nephritis (Alport's syndrome). Lab. Invest. 27:473-487

Hostikka S.L., Eddy R.L., Byers M.G., Höyhty M., Shows T.B., Tryggvason K., (1990) Identification of a distinct type IV collagen α chain with restricted kidney distribution and assignment of its gene to the locus of X chromosome-linked Alport syndrome. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1606-1610

Howe J.R., Skryabin B.V., Belcher S.M., Zerillo C.A., Schmauss C. (1995) The responsiveness of a tetracycline-sensitive expression system differs in different cell lines. J. Biol. Chem. 270(23):14168-14174.

Hudson B.G., Windom B.J., Gunwar S., Noelken M.E., (1992) Collagen IV: role in Goodpasture syndrome, Alport-type familial nephritis, and diabetic nephropathy. Kang A., Nimmi M.E., (eds), Collagen, Volume V, Pathobiochemistry, Boca Raton, Florida:CRC, p17-30

Hudson B.G., Reenders S.T., Tryggvason K., (1993) Type IV collagen: structure, gene organization, and role in human diseases. J. Biol. Chem. 268(35):26033-26036

Hynes R.O., (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. Cell 69:11-25

Joyce N.C., Haire M.F., Palade G.E., (1987) Morphological and biochemical evidence for a contractile cell network within the rat intestinal mucosa. Gastroenterology 92:68-81

Kashtan C.E., Kleppel M.M., Gubler M.C., (1996) Immunohistochemical findings in Alport syndrome. Tryggvason K. (ed), Molecular pathology and genetics of Alport syndrome, Basel: Karger, p.142-153

Kauffmann R., Froch D., Westphal C., Weber L., Klein C.E., (1989) Integrin VLA-3: ultrastructural localization at cell-cell contacts sites of human cell cultures. J. Cell. Biol. 109:1807-1815

Kedinger M., Simon-Assmann P., Haffen K., (1987) Importance of a fibroblastic support for *in vitro* differentiation of intestinal endodermal cells and for their response to glucocorticoids. Cell Diff. 20:171-182

Kivirikko K.I., (1993) Collagens and their abnormalities in a wide spectrum of diseases. Ann. Med. 25:113-126

Kleinman H.K., Graf J., Iwamoto Y., Kitten G.T., Ogle R.C., Sasaki M., Yamada Y., Martin G.R., Luckenbilledds L., (1987) Role of basement membranes in cell differentiation. Ann. N.Y. Acad. Sci. 513:134-145

Kleppel M.M., Kashtan C., Santi P.A., Wieslander J., Michael A.F., (1989) Distribution of familial nephritis antigen in normal tissue and renal basement membrane of patients with homozygous and heterozygous Alport familial nephritis. Lab. Invest. 61:278-289

Kleppel M.M., Michael A.F., (1990) Expression of novel basement membrane components in the developing kidney and eye. *Am. J. Anat.* 187:165-174

Knebelmann B., Breillat C., Forestier L., Arrondel C., Jacassier D., Giatras I., Drouot L., Deschênes G., Grüfeld J., Broyer M., Gubler M.C., Antignac C., (1996) Spectrum of mutations in the COL4A5 collagen gene in X-linked Alport syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 59:1221-1232.5

Kurkinen M., Taylor A., Garrels J.I., Hogan B., (1984) Cell surface-associated proteins which bind native type IV collagen or gelatin. *J. Biol. Chem.* 259(9):5915-5922

Laemmli U.K., (1970) Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond)* 227:680-685

Larjava H., Peltonen J., Akiyama S.D., Yamada S.S., Gralnick H.R., Uitto J., Yamada K.M., (1990) Novel function for $\beta 1$ integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *J. Cell. Biol.* 110:803-815

Lampugnani M.G., Resnati M., Dejana E., Marchisio P.C., (1991) The role of integrins in the maintenance of endothelial monolayer integrity. *J6. Cell. Biol.* 112:479-490

Leblond C.P., (1981) The life history of cells in renewing systems. Am. J. Anat. 160:114-159

Leblond C.P., Inoue S., (1989) Structure, composition, and assembly of basement membrane. Am. J. Anat. 185:367-390

Le Douarin N., (1964) Étude expérimentale de l'organogénèse du tube digestif et du foie chez l'embryon de poulet. Bull. Biol. Fr. Belg. 98:543-676

Levy R., Czernobilsky B., Geiger B., (1988) Subtyping of epithelial cells of normal and metaplastic human uterine cervix using polypeptide-specific cytokeratin antibodies. Differentiation 39:185-196

Lin C.Q., Bissell M.J., (1993) Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. FASEB J. 7:737-743

Magalini A., Ferrari F., Savolke G., Ingrassia R., Albertini A., Pollio G., Patrone C., Maggi A., Lorenzo D.D., (1995) Specificity of action of a Herpes virus VP16/tetracycline-dependent trans-activator in mammalian cell cultures. DNA Cell Biol. 14(8):665-671

Martin G.R., Timpl R., Kuhn K., (1988) Basement membrane proteins: molecular structure and function. Adv. Protein Chem. 39:1-50

McDonald J.A., (1989) Matrix regulation of cell shape and gene expression. Curr. Opin. Cell Biol. 1:995-999

Ménard D., (1989) Growth-promoting factors and the development of the human gut. Human gastrointestinal development, Lebenthal E. (ed), Raven Press., New York, p.123-125

Ménard D., Beaulieu J.-F., (1994) Human intestinal brush border membrane hydrolases. Membrane physiopathology, Bakaly G. (ed), Kluwer Academic Publishers, Boston, p.319-341

Merker H.-J., (1994) Morphology of the basement membrane. Microsc. Res. Tech. 28:95-124

Montessano R., (1986) Cell-extracellular matrix interactions in morphogenesis: an *in vitro* approach. Experientia 42:977-985

Ninomiya Y., Kagawa M., Iyama K.-I., Naito I., Kishire Y., Seyer J.M., Sugimoto M., Ohashi T., Sado Y., (1995) Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. J. Cell. Biol. 130(5):1219-1229

Oohashi T., Sugimoto M., Mattei M.-G., Ninomiya H., (1994) Identification of a new collagen IV chain, $\alpha 6(\text{IV})$ and comparison with five other type IV collagen chains. J. Biol. Chem. 269:7520-7526

Paul C.A., Hochman J., Quaroni A., (1993) Conditionally immortalized intestinal epithelial cells: novel approach for study of differentiated enterocytes. Am. J. Physiol. 265:C266-C278

Paulsson M., (1992) Basement membrane proteins: structure, assembly, and cellular interactions. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 27:93-127

Peissel B., Geng L., Kalluri R., Kashtan C., Rennke H.G., Gallo G.R., Yoshioka D., Jane Sun M., Hadson B.G., Neilson E.G., Zhou J., (1995) Comparative distribution of the $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in normal human adult and fetal tissues and in kidneys from X-linked Alport syndrome patients. Lab. Invest. 96:1948-1957

Perrault N., Beaulieu J-F., (1996) Use of the dissociating enzyme thermolysine to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. Exp. Cell Res. 224:354-364

Potten C.S., Loeffler M., (1991) Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties: lessons for and from the crypt. Development 110:1001-1020

Podolsky D.K., (1993) Regulation of intestinal epithelial proliferation: a few answers, many questions. *Am. J. Physiol.* 264:G179-G186

Prockop D.J., Kivirikko K.I., (1995) Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 64:403-434

Resnitzky D., Gossen M., Byjard H., Reed S.I., (1994) Acceleration of the G₁/S phase transition by expression of cyclins D1 and E with an inducible system. *Mol. Cell. Biol.* 14:1669-1679.

Renieri A., Bruttini M., Galli L., Zanelli P., Neri T., Rossetti S., Turco A., Heiskari N., Zhou J., Gusmano R., Massella L., Banfi G., Scolari F., Sessa A., Rizzoni G., Tryggvason K., Pignatti P.F., Savi M., Ballabio A., De Marchi M., (1996) X-linked Alport syndrome: an SSCP-based mutation survey over all 51 exons of the COL4A5 gene. *Am. J. Hum. Genet.* 58:1192-1204

Ruoslahti E., (1991) Integrins. *J. Clin. Invest.* 87:1-5

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989) In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York

Sanders E.J., (1988) The role of epithelial-mesenchymal cell interactions in developmental processes. *Biochem. Cell Biol.* 66:530-540

Schwartz M.A., (1992) Transmembrane signaling by integrins. Trends Cell Biol. 2:304-308

Simon-Assmann P., Bouziges F., Arnold C., Haffen K., Keding M., (1988) Epithelial-mesenchymal interactions in the production of basement membrane components in the gut. Development 102:339-347

Simon-Assman P., Bouziges F., Freund J.N., Perrin-Schmitt F., Keding M., (1990) Type IV collagen mRNA accumulates in the mesenchymal compartment at early stage of murine developing intestine. J. Cell. Biol. 110:849-857

Spear G.S., Slusser R.J., (1972) Alport's syndrome: emphasizing electron microscopic studies of the glomerulus. Am. J. Pathol. 69:213-224

Stallmach A., Hahn U., Merker H.J., Hahan E.G., Rieken E.O., (1989) Differentiation of rat intestinal epithelial cells is induced by organotypic mesenchymal cells *in vitro*. Gut 30:959-970

Sugimoto M., Oohashi T., Ninomiya Y., (1994) The genes COL4A5 and COL4A6, coding for basement membrane collagen chains $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$, are located head-to-head in close proximity on human chromosome Xq22 and Col4A6 is transcribed from two alternative promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:11679-11683

Suh E., Traber P.G., (1996) An intestine-specific homeobox gene regulates proliferation and differentiation. *Mol. Cell. Biol.* 16(2):619-625

Takahashi M., Altschmied L. Hillen W., (1986) Kinetic and equilibrium characterization of the Tet repressor-tetracycline complex by fluorescence measurements. *J. Mol. Biol.* 187:341-348

Takiguchi-Hayachi K., Yasugi S., (1990) Localized distribution of a novel mesenchyme-specific antigen in developing chick digestive organs. Comparison with the distribution of fibronectin, laminin and tenascin. *Roux's Arch. Dev. Biol.* 200:113-116

Thomas J.O., Kornberg R.D., (1975) An octamer of histone in chromatin and free in solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2626-2630

Timpl R., Dziadek M., (1986) Structure, development, and molecular pathology of basement membranes. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 29:1-112

Timpl R., (1989) Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 180:487-502

Timpl R., Brown J.C., (1996) Supramolecular assembly of basement membranes. *BioEssays* 18:123-132

Towbin H., Staehelin T., Gordon J., (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354

Turner A.N., Rees A.J., (1996) Goodpasture's disease and Alport's syndromes. Annu. Rev. Med. 47:377-386

Tyggvason K., Zhou J., Hostikka S.L., Shows T.B., (1990) Molecular genetics of Alport syndrome. Kidney Int. 43:38-44

Tyggvason K., Zhou J., Hostikka S.L., Shows T.b., (1993) Molecular genetics of Alport syndrome. Kidney Int. 43:38-44

Vachon P.H., Beaulieu J-F., (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. Gastroenterology 103:414-423

Vachon P.H., Durand J., Beaulieu J-F., (1993) Basement membrane formation and re-distribution of $\beta 1$ integrins in human co-culture system. Anat. Rec. 236:567-576

Van Beers E.H., Al R.H., Rings E.H.H.M., Einerhand A.W.C., Dekker J., Büller H.A., (1995) Lactase and sucrase-isomaltase gene expression during Caco-2 cell differentiation. Biochem. J. 308:769-775

Van der Rest M., (1987) Biologie du collagène et maladies héréditaires de la matrice extracellulaire. Med. Sci. 3:411-420

Weber M., Netzer K.-O., Pullig O., (1992) Molecular aspects of Alport's syndrome. Clin. Invest. 70:809-815

Wu Z., Xie Y., Bucher N.L.R., Farmer S.R., (1995) Conditional ectopic expression of C/EBP β in NIH-3T3 cells induces PPAR γ and stimulates adipogenesis. Genes Dev. 9:2350-2363

Wyborski D.L., Short J.M., (1991) Analysis of inducers of the *E.coli* lac repressor system in mammalian cells and whole animals. Nucl. Acids Res. 19:4647-4653

Yasugi S., (1993) Role of epithelial-mesenchymal interactions in differentiation of epithelium of vertebrate digestive organs. Dev. Growth Differ. 35:1-9

Yin D.X., Zhu L., Schimke R.T., (1996) Tetracycline-controlled gene expression system achieves high-level and quantitative control of gene expression. Anal. Biochem. 235:195-201

Yurchenco P.D., Schittny J.C., (1990) Molecular architecture of basement membranes. FASEB J. 4:1577-1590

Zhang Y., Keck J.G., Moss B., (1992) Transcription of viral late genes is dependent on expression of the viral intermediate gene G8R in cells infected with an inducible conditional-lethal mutant vaccinia virus. J. Virol. 66:6470-6479

Zhou J., Mochizuki T., Smeets H., Antignac C., Laurila P., De Paepe A., Tryggvason K., Reenders S.T., (1993) Deletion of the paired $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen genes in inherited smooth muscle tumors. Science 261:1167-1169

Zhou J., Zhao M.D.Z., Reenders S.T., (1994) Complete primary structure of the sixth chain of human basement membrane collagen, $\alpha 6(\text{IV})$. J. Biol. Chem. 269:13193-13199

ARTICLE EN PRÉPARATION

Perreault N., Desloges, N., Beaulieu J-F., Epithelial and mesenchymal contribution to basement membrane determined by a non enzymatic method of dissociation of human intestinal epithelium.